P. ENT COOPERATION TREAT

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 23 November 2000 (23.11.00)	
International application No. PCT/JP00/02878	**Applicant's or agent's file reference** MAT-101PCT
International filing date (day/month/year) 01 May 2000 (01.05.00)	**Priority date** (day/month/year) 30 April 1999 (30.04.99)
Applicant MATSUMOTO, Akira	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

[X] in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

19 October 2000 (19.10.00)

[] in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election [X] was

[] was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO **34, chemin des Colombettes** **1211 Geneva 20, Switzerland**	Authorized officer Diana Nissen
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

This Page Blank (uspto)

14T

RECD 20 JUL 2001
WIPO PCT

特　許　協　力　条　約

PCT

国際予備審査報告

（法第１２条、法施行規則第56条）
〔ＰＣＴ３６条及びＰＣＴ規則70〕

出願人又は代理人の書類記号　ＭＡＴ－１０１ＰＣＴ	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式ＰＣＴ／ＩＰＥＡ／４１６）を参照すること。	
国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ００／０２８７８	国際出願日（日.月.年）　０１．０５．００	優先日（日.月.年）　３０．０４．９９
国際特許分類（ＩＰＣ）　Int.Cl⁷ C12N 9/48, 15/57, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/40, C12Q 1/37, A61K 38/48, 39/395, 45/00, G01N 33/573		
出願人（氏名又は名称）　松本　明		

１．　国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（ＰＣＴ３６条）の規定に従い送付する。

２．　この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で　5　ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
（ＰＣＴ規則70.16及びＰＣＴ実施細則第６０７号参照）
この附属書類は、全部で＿＿＿＿＿＿ページである。

３．　この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎

II ☐ 優先権

III ☒ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

IV ☐ 発明の単一性の欠如

V ☒ ＰＣＴ３５条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明

VI ☐ ある種の引用文献

VII ☐ 国際出願の不備

VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日　１９．１０．００	国際予備審査報告を作成した日　０４．０７．０１
名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＰＥＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　２９３７ 本間　夏子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

様式ＰＣＴ／ＩＰＥＡ／４０９（表紙）（１９９８年７月）

This Page Blank (uspto)

国際予備審査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ００／０２８７８

Ⅰ．　国際予備審査報告の基礎

1．　この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第６条（ＰＣＴ１４条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。ＰＣＴ規則70.16, 70.17）

☒ 出願時の国際出願書類

☐ 明細書　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ ページ、　出願時に提出されたもの
明細書　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ ページ、　国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ ページ、　＿＿＿＿＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ 項、　出願時に提出されたもの
請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ 項、　ＰＣＴ１９条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ 項、　国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ 項、　＿＿＿＿＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 図面　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ ページ／図、　出願時に提出されたもの
図面　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ ページ／図、　国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ ページ／図、　＿＿＿＿＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

☐ 明細書の配列表の部分　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ ページ、　出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ ページ、　国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ ページ、　＿＿＿＿＿＿＿＿ 付の書簡と共に提出されたもの

2．　上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である ＿＿＿＿＿＿＿＿ 語である。

☐ 国際調査のために提出されたＰＣＴ規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ ＰＣＴ規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたＰＣＴ規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3．　この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☒ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4．　補正により、下記の書類が削除された。
☐ 明細書　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ ページ
☐ 請求の範囲　第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ 項
☐ 図面　図面の第 ＿＿＿＿＿＿＿＿ ページ／図

5．☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。（ＰＣＴ規則70.2(c)　この補正を含む差し替え用紙は上記１．における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。）

This Page Blank (uspto)

国際予備審査報告 | 国際出願番号 PCT／JP00／02878

Ⅲ. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1．次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範囲 27 － 29

理由：

☒ この国際出願又は請求の範囲 27 － 29 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

人の身体の診断方法である。

☐ 明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 _____ の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

☐ 全部の請求の範囲又は請求の範囲 _____ が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範囲 27 － 29 について、国際調査報告が作成されていない。

2．ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすることができない。

☐ 書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

☐ フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

This Page Blank (uspto)

Ⅴ．　新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第１２条（ＰＣＴ３５条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

１．　見解

新規性（N）	請求の範囲	1, 5-8, 11-15, 18-26, 30-31	有
	請求の範囲	２－４，９－１０，１６－１７	無
進歩性（ＩＳ）	請求の範囲	１，１５，１８－２６，３０－３１	有
	請求の範囲	２－１４，１６－１７	無
産業上の利用可能性（ＩＡ）	請求の範囲	１－２６，３０－３１	有
	請求の範囲		無

２．　文献及び説明（ＰＣＴ規則70.7）

文献１：J. Biol. Chem. (1991, Nov.) Vol. 266, No. 32, p. 21833-21838
文献２：Neurosci. Lett. (1998, Feb.) Vol. 242, No. 2, p. 109-113

請求の範囲２－４，９－１０

請求の範囲２－４，９－１０に記載された発明は、国際調査報告で引用された上記文献１により新規性を有しない。

文献１には、ヒト血漿由来のカルボキシペプチダーゼＢ（血漿ＣＰＢ）のアミノ酸配列及び該アミノ酸配列をコードする塩基配列が記載されている。

文献１に記載のアミノ酸配列は、本願の請求の範囲２（ａ）に記載されている、配列番号２に記載のアミノ酸配列において、複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列である。

また、文献１に記載の塩基配列は、本願の請求の範囲２（ｂ）及び１０に記載されている、配列番号１に記載の塩基配列からなるＤＮＡとハイブリダイズし得るものである。

請求の範囲１６－１７

請求の範囲１６－１７に記載された発明は、国際調査報告で引用された上記文献２により新規性を有しない。

文献２には、コンドロイチナーゼＡＢＣが記載されている。このコンドロイチナーゼＡＢＣは、脳ＣＰＢのペプチダーゼ活性を阻害するものと認められる。

This Page Blank (uspto)

補充欄（いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること）

第　Ｖ　欄の続き

請求の範囲５－８，１１－１４．１６－１７

請求の範囲５－８，１１－１４．１６－１７に記載された発明は、国際調査報告で引用された上記文献１により進歩性を有しない。

本出願前において、あるタンパク質をコードするＤＮＡが公知ならば、該ＤＮＡをベクターに導入し、宿主細胞を形質転換して、形質転換された宿主細胞を用いて該タンパク質を製造することは周知技術である。また、取得したタンパク質を用いて、該タンパク質に結合する、あるいは該タンパク質の活性を調節する化合物をスクリーニングすることも同様である。

以上を勘案すると、文献１に記載のタンパク質において、上記周知技術を適用し、該タンパク質をコードするＤＮＡを含むベクター、及び該ベクターを保持する宿主細胞を得ること、該宿主細胞を用いて該タンパク質を製造すること、及び、該タンパク質を用いて各種化合物のスクリーニングを行うことは、当業者であれば容易になし得るものである。

請求の範囲１，１５，１８－２６，３０－３１

請求の範囲１，１５，１８－２６，３０－３１に記載された発明は、国際調査報告で引用された上記文献１に対して進歩性を有する。

カルボキシペプチダーゼがヒト脳において発現し、それが脳におけるβ－アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）に対するペプチダーゼ活性を有することは、上記文献１には記載されておらず、しかもその点は当業者といえども容易に想到し得ないものである。

This Page Blank (uspto)

特　許　協　力　条　約

PCT

EP ・ US

国際調査報告

（法８条、法施行規則第40、41条）
〔ＰＣＴ１８条、ＰＣＴ規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 ＭＡＴ－１０１ＰＣＴ	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式（ＰＣＴ／ＩＳＡ／２２０）及び下記５を参照すること。	
国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ００／０２８７８	国際出願日 （日.月.年）　０１．０５．００	優先日 （日.月.年）　３０．０４．９９
出願人（氏名又は名称） 松本　明		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条（ＰＣＴ１８条）の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で　4　ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

１．国際調査報告の基礎

ａ．言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

ｂ．この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

２．☒ 請求の範囲の一部の調査ができない（第Ⅰ欄参照）。

３．☐ 発明の単一性が欠如している（第Ⅱ欄参照）。

４．発明の名称は
☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

５．要約は
☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第Ⅲ欄に示されているように、法施行規則第47条（ＰＣＴ規則38.2(b)）の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から１カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

６．要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。☐ 出願人が示したとおりである。　☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

This Page Blank (uspto)

国際調査報告　　国際出願番号 PCT／JP00／02878

第Ⅰ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☒ 請求の範囲 ２７－２９ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲２７－２９は、人の身体の診断方法に関するものであって、国際調査機関が国際調査することを要しない対象にあたる。

2．☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

This Page Blank (uspto)

国際調査報告

国際出願番号 PCT／JP00／02878

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl⁷ C12N 9/48, 15/57, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/40, C12Q 1/37, A61K 38/48, 39/395, 45/00, G01N 33/573

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl⁷ C12N 9/48-9/76, 15/00-15/90, 1/10-1/21, 5/10-5/28, C07K 16/40, C12P 21/00-21/02, C12Q 1/34-1/37

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル(JOIS), CA(STN), REGISTRY(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
P, X	MATSUMOTO, A. et al. "A novel carboxypeptidase B that processes native beta-amyloid precursor protein is present in human hippocampus.", Eur. J. Neurosci. (2000, Jan.) Vol. 12, No. 1, p. 227-238	1-26, 30, 31
X	EATON, D. L. et al. "Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma.", J. Biol. Chem. (1991, Nov.) Vol. 266, No. 32, p. 21833-21838	10
X	SHIOI, J. et al. "Chondroitin sulfate proteoglycan form of the	12, 13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 29.05.00	国際調査報告の発送日 06.06.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 内田 俊生　4N 2937 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

様式PCT／ISA／210（第2ページ）（1998年7月）

This Page Blank (uspto)

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
	Alzheimer's beta-amyloid precursor.", J. Biol. Chem. (1992, Jul.) Vol. 267, No. 20, p. 13819-13822	
X	KANG, J. et al. "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.", Nature (1987, Feb.) Vol. 325, No. 6106, p. 733-736	12, 13
X	MATSUMOTO, A. et al. "A human brain proteolytic activity capable of cleaving natural beta-amyloid precursor protein is affected by its substrate glycoconjugates.", Neurosci. Lett. (1998, Feb.) Vol. 242, No. 2, p. 109-113	16, 17
A	TAN, A. K. et al. "Activation and characterization of procarboxypeptidase B from human plasma.", Biochemistry (1995, May) Vol. 34, No. 17, p. 5811-5816	1-26, 30, 31
A	MATSUMOTO, A. et al. "Aberrant proteolysis of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease lymphoblastoid cells.", Eur. J. Biochem. (1993, Oct.) Vol. 217, No. 1, p. 21-27	1-26, 30, 31
A	MATSUMOTO, A. et al. "Abnormal and deficient processing of beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease lymphoblastoid cells.", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1991, Mar.) Vol. 175, No. 2, p. 361-365	1-26, 30, 31

This Page Blank (uspto)

IT

Translation

RECEIVED
APR 0 3 2002
TECH CENTER 1600/2900

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

9/980881

Applicant's or agent's file reference MAT-101PCT	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/02878	International filing date (*day/month/year*) 01 May 2000 (01.05.00)	Priority date (*day/month/year*) 30 April 1999 (30.04.99)

International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC
C12N 9/48, 15/57, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/40, C12Q 1/37, A61K 38/48, 39/395, 45/00, G01N 33/573

RECEIVED
MAY 0 9 2002
TECH CENTER 1600/2900

Applicant: MATSUMOTO, Akira

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 6 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
19 October 2000 (19.10.00)	04 July 2001 (04.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/JP00/02878

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

☒ the international application as originally filed

☐ the description:

pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

☐ the claims:

pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

☐ the drawings:

pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

☐ the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).

☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).

☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

☐ contained in the international application in written form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☒ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

☐ the description, pages _____
☐ the claims, Nos. _____
☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* *Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).*

** *Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.*

This Page Blank (uspto)

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 27-29

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 27-29 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination *(specify)*:

See supplemental sheet for continuation of Box III. 1.

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. _____ are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 27-29 .

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

This Page Blank (uspto)

Supplemental Box
(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III. 1.

Claims 27-29 pertain to diagnostic methods practised on the human body.

This Page Blank (uspto)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1, 5-8, 11-15, 18-26, 30-31	YES
	Claims	2-4, 9-10, 16-17	NO
Inventive step (IS)	Claims	1, 15, 18-26, 30-31	YES
	Claims	2-14, 16-17	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-26, 30-31	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Document 1: J. Biol. Chem. (1991, Nov.), Vol. 266, No. 32, pp. 21833-21838

Document 2: Neurosci. Lett. (1998, Feb.), Vol. 242, No. 2, pp. 109-113

Claims 2-4, 9 and 10

The inventions described in Claims 2-4, 9 and 10 are not novel over Document 1, cited in the international search report.

Document 1 discloses the amino acid sequence of carboxypeptidase B from human plasma (plasma CBP) and the nucleotide sequence coding said amino acid sequence.

The amino acid sequence disclosed in Document 1 is the amino acid given in SEQ ID NO:2 with the exchange, deletion, insertion and/or addition of a plurality of amino acids, as described in Claim 2(a) in the present application.

Moreover, the nucleotide sequence disclosed in Document 1 can hybridize with DNA comprising the nucleotide sequence given in SEQ ID NO:1, as described in Claim 2(b) and Claim 10.

Claims 16 and 17

The inventions described in Claims 16 and 17 are not

This Page Blank (uspto)

novel over Document 2, cited in the international search report.

Document 2 discloses chondroitinase ABC. This chondroitinase ABC inhibits brain CPB peptidase activity.

Claims 5-8, 11-14, 16 and 17

The inventions described in Claims 5-8, 11-14, 16 and 17 do not involve an inventive step in the light of Document 1, cited in the international search report.

It was known before the present application that when the DNA coding a given protein is known, said DNA can be introduced into a vector to transform host cells and the transformed host cells can be used to produce said protein; and the same applies to the use of the resulting protein to screen compounds which bind to said protein or regulate the activity of said protein.

Given this, a person skilled in the art could easily apply the aforementioned techniques to the protein disclosed in Document 1 to obtain a vector incorporating DNA coding said protein and host cells retaining said vector, to produce said protein using said host cells, and to screen different compounds by using said protein.

Claims 1, 15, 18-26, 30 and 31

The inventions described in Claims 1, 15, 18-26, 30 and 31 involve an inventive step relative to the documents cited in the international search report.

Document 1 does not mention that carboxypeptidase is expressed in the brain and that this has peptidase activity against β-amyloid precursor protein (APP), and this could not be easily deduced by a person skilled in the art.

This Page Blank (uspto)

世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7
C12N 9/48, 15/57, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/40, C12Q 1/37, A61K 38/48, 39/395, 45/00, G01N 33/573

A1

(11) 国際公開番号 WO00/66717

(43) 国際公開日 2000年11月9日(09.11.00)

(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02878

(22) 国際出願日 2000年5月1日(01.05.00)

(30) 優先権データ
特願平11/125169 1999年4月30日(30.04.99) JP

(71) 出願人；および
(72) 発明者
松本 明(MATSUMOTO, Akira)[JP/JP]
〒547-0035 大阪府大阪市平野区西脇3丁目5番11号 Osaka, (JP)
(74) 代理人
清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.)
〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
Ibaraki, (JP)

(81) 指定国 AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: **HUMAN BRAIN CARBOXYPEPTIDASE B**

(54)発明の名称 ヒト脳カルボキシペプチダーゼB

(57) **Abstract**

A novel carboxypeptidase successfully identified by a screening from human hippocampus extract with the use as an indication of an activity of cleaving brain APP; and a gene encoding this protein. This protein and its gene are useful in, for example, preventing, treating, examining and diagnosing Alzheimer's disease, etc.

(57)要約

ヒト海馬抽出物から、脳APPを切断する活性を指標にしたスクリーニングにより、新規なカルボキシペプチダーゼを同定することに成功した。さらに、このタンパク質をコードする遺伝子を単離した。該タンパク質やその遺伝子は、アルツハイマー病等の予防、治療、検査、診断などに有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボズニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルギナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴー
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ	ML	マリ	TT	トリニダッド・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CG	コンゴー	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	YU	ユーゴースラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュー・ジーランド	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク	KR	韓国				

明細書

ヒト脳カルボキシペプチダーゼB

技術分野

本発明は、新規なカルボキシペプチダーゼおよびその遺伝子、並びにそれらの製造および用途に関する。

背景技術

アルツハイマー病（AD）は脳皮質に生じる神経変性疾患であり、疾患の進行に伴って徐々にニューロンが消失することから最終的には痴呆に至る。主な神経病理学的所見は、脳萎縮、老人斑、神経原線維集積物およびアミロイドアンギオパシーである。アルツハイマー病と脳の正常老化のいずれにおいても、ニューロンの喪失と、老人斑および脳血管性アミロイドの主要かつ必須な構成要素であるAβの異常沈着が空間的に特有な様式で出現し、この種の病変は記憶と認知にかかわる海馬や嗅内皮質（enthorhinal cortex）といった大脳皮質の特定領域に主に認められる。数々の所見から、いくつかの種類の家族性アルツハイマー病や関連疾患の原因はAβの内部や周囲に生じたミスセンス変異であることが示唆される（Chartier-Harlin, M. -C. et al. (1991) Nature, 353, 844-846; Haass, C. et al.(1995) Nature Med., 1, 1291-1296; Van Broeckhoven, C. et al.(1990) Science, 248, 1120-1122）。別の種類の家族性アルツハイマー病の原因となる2つの遺伝子は、小胞体および／またはゴルジ複合体の内部で発現すると推定される類似した膜貫通タンパク質であるプレセニリン1および2をコードすることが同定されている（Sherrington, R. et al. (1995) Nature 375: 754-760; Levy-Lahad, E. et al. (1995) Science 269: 970-977）。このようなタンパク質は、新たに合成されたβ-アミロイド前駆体タンパク質（APP）などのタンパ

ク質の修飾およびプロセッシングに関与すると思われる。脳内に認められるAβペプチドの中でも、Aβ1-42はアミロイド形成性が高く、神経細胞内での増加がアルツハイマー病の病態生理と直接関係している可能性がある（Hardy, J.（1995) Trends. Neurosci, 20, 154-159; Beyreuther, K. and Masters, C.L.（1997) Nature, 389, 677-678; Younkin, S.G.（1995) Ann. Neurol., 37, 287-288）。最近、Aβ1-42は小胞体で、Aβ1-40はトランスゴルジネットワークで産生されるというように、Aβが産生される神経細胞内の特定の部位が同定されている（Hartmann, T. et al.(1997) Nature Med., 3, 1016-1020; Cook, D.G. et al.(1997) Nature Med., 3, 1021-1023）。以上の所見は、APPおよびAβペプチドの修飾、プロセッシングまたは輸送における何らかの障害が、アルツハイマー病の病態生理に本質的に関係していることを強く示唆する。稀な家族性アルツハイマー病の症例では原因遺伝子およびタンパク質がいくつか同定されているが、アルツハイマー病患者の大半（95%を超える）は孤発性であり、疾患過程の原因となる遺伝子やタンパク質はまだ同定されていない。個々のアルツハイマー病患者の主な原因が何であれ、アルツハイマー病の進行は脳内Aβの蓄積および凝集をもたらし、それは最終的にはおそらくCa^{2+}イオンチャネルの形成、ミクログリアによるフリーラジカルの生成および／またはアポトーシス機構を介して神経死を誘発する（Loo, D.T. et al.(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7951-7955; Arispe, N. et al.(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90,567-571）。

Aβ分子種が生成されるタンパク質分解過程は未だ明らかになっていない。α、βまたはγ-セクレターゼ活性を有するプロテアーゼの候補は種々の種および臓器から同定されているが、その大半は合成基質を用いた活性のアッセイによって調製されたものであり、このような候補プロテアーゼの中で天然型APP基質に対する活性を持つものはわずかに過ぎない。家族性アルツハイマー病の原因となる同定された遺伝子のいずれかをトランスジェニックマウスで誘導させ、ヒト脳内

で認められる神経病理学的所見を得ようとの試みは成功していない。線維状Aβのマイクロインジェクションを行ったサル脳に関する最近の所見からは、特に高等霊長類では、Aβの in vivo 神経毒性が加齢脳で一種の病理反応を起こすことが示唆されている（Geula, C. et al.(1998) Nature Med., 4, 827-831）。以上の所見から、AβおよびAβ含有ペプチドが、種および組織に特異的な様式で生成されることが示唆されるが、その分子メカニズムは明らかにされていない。

発明の開示

本発明は、脳で発現し、脳APPに対するペプチダーゼ活性を有する新規なカルボキシペプチダーゼ、およびその遺伝子、並びにそれらの製造方法および用途を提供することを課題とする。

本発明者らは以前、家族性アルツハイマー病患者に由来するリンパ芽球細胞におけるAPPおよびAβ含有ペプチドのプロセッシングを解析した（Matsumoto, A. and Fujiwara,Y. (1993) Eur. J. Biochem., 217, 21-27; Matsumoto, A. and Matsumoto,R. (1994) Eur. J. Biochem., 225, 1055-1062）。家族性アルツハイマー病細胞の培地には、合成基質に対するβ-セクレターゼ様活性を示す68kDaのセリンプロテアーゼが認められた（Matsumoto, A. and Fujiwara,Y. (1994) Biochemistry, 33, 3941-3948）。このプロテアーゼは、リンパ芽球細胞（LAP）から調製した天然型APPおよびそのAβ含有断片を、Aβ-N末端の近傍部位で切断した（Matsumoto, A. et al.(1995) Neurosci. Lett., 195, 171-174）。しかし、このセリンプロテアーゼの活性を、正常ヒト脳から調製した天然型脳APPを基質に用いて測定したところ、該プロテアーゼは天然型脳APPを分解しないことが判明した。このことから本発明者らは、基質としての天然型APPには組織特異性があり、脳において発現しているプロテアーゼを、天然型脳APPの切断活性を指標に検索することで、天然型脳APPを基質とする新規なプロテアーゼを同定できるはずだと考えた。

そこで、本発明者らは、ヒト海馬のホモジネート分画物を天然型脳APPのタンパク質分解活性に関して検索し、活性画分を分析することにより、脳APPを複数の部位で切断してAβ含有ペプチドを生成する活性を有する40kDaのタンパク質を分離することに成功した。このタンパク質を解析したところ、カルボキシペプチダーゼ（CP）ファミリーに属する新規プロテアーゼであることが判明した。このプロテアーゼ（脳カルボキシペプチダーゼB；脳CPB）は血漿CPBが選択的スプライシングを受けたアイソフォームではなく、C末端14アミノ酸などの特定の特徴を有していた。ヒト脳CPB cDNAプローブを用いたノーザン解析およびヒト脳CPB特異的抗体を用いたウエスタン解析から、このプロテアーゼが脳特異的に発現していることが判明した。免疫組織化学試験では、このプロテアーゼが正常脳の神経細胞体、特に海馬錐体ニューロンと上衣－脈絡叢細胞、およびミクログリアの内部で発現されていることが示された。また、髄液および血液中にも微量ながら存在していた。孤発性アルツハイマー病患者の脳では、神経における発現の低下と、細胞外沈着を伴うプロテアーゼ免疫反応性のミクログリアのクラスターが検出された。さらに、抗AβN端抗体を利用したウェスタン解析から、ヒト脳CPBが、AβペプチドをそのC末端から分解するエキソペプチターゼ活性を有することが判明した。

以上の所見は、本発明者等により単離された脳CPBがAPPプロセッシングにおいて生理的機能を果たしており、アルツハイマー病の病態生理にも重要であることを示唆している。従って、本発明者等により単離された脳CPBは、それ自体アルツハイマー病の予防、治療のための薬剤として、また、該予防や治療のための薬剤のスクリーニングへの利用が可能である。さらに本発明者等により単離された脳CPBは、アルツハイマー病の検査への利用も可能である。

また、本発明者等により単離された脳CPBやその活性を調節しうる化合物は、上記したアルツハイマー病に限られず、広くAβの蓄積を生じる疾患の予防、治療、診断への応用が可能であると考えられる。

従って、本発明は、

（１） 配列番号：２から４のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、

（２） 脳APPに対するペプチダーゼ活性を有するタンパク質であって、下記（ａ）または（ｂ）より選択されるタンパク質、

（ａ）配列番号：２から４のいずれかに記載のアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質、

（ｂ）配列番号：１に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質、

（３） （１）または（２）に記載のタンパク質をコードするDNA、

（４） 配列番号：１に記載の塩基配列のコード領域を含む、（３）に記載のDNA、

（５） （３）または（４）に記載のDNAが挿入されたベクター、

（６） （５）に記載のベクターを保持する宿主細胞、

（７） （６）に記載の宿主細胞を培養し、該細胞内で発現した組み換えタンパク質を該細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、（１）または（２）に記載のタンパク質の製造方法、

（８） （１）または（２）に記載のタンパク質に対する抗体、

（９） （１）または（２）に記載のタンパク質の部分ペプチド、

（１０） 配列番号：１に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも１５塩基の鎖長を有するポリヌクレオチド、

（１１） （１）または（２）に記載のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

（ａ）該タンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

（ｂ）該タンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

（ｃ）該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

（１２）　（１）または（２）に記載のタンパク質に結合する化合物、

（１３）　（１１に記載の方法により単離されうる、（１２）に記載の化合物、

（１４）　（１）または（２）に記載のタンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

（ａ）被検試料の存在下で、（１）または（２）に記載のタンパク質にその基質を接触させる工程、

（ｂ）該基質の切断を検出する工程、および

（ｃ）被検試料非存在下において検出した場合（対照）比較して、（１）または（２）に記載のタンパク質により引き起こされる該基質の切断を増加または減少させる活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

（１５）　基質が脳 APP である、（１４）に記載の方法、

（１６）　（１）または（２）に記載のタンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する活性を有する化合物、

（１７）　（１４）または（１５）に記載の方法により単離されうる、（１６）に記載の化合物、

（１８）　（１）または（２）に記載のタンパク質を有効成分とする、Aβの生成調節剤、

（１９）　（１）または（２）に記載のタンパク質を有効成分とする、脳におけるAβの蓄積を生じる疾患の治療薬、

（２０）　脳におけるAβの蓄積を生じる疾患が、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される、（１９）に記載の治療薬、

（２１）　（１２）、（１３）、（１６）または（１７）に記載の化合物を有効成分とする、Aβ生成調節剤、

（２２）　（１２）、（１３）、（１６）または（１７）に記載の化合物を有効成分とする、脳におけるAβの蓄積を生じる疾患の治療薬、

（２３）　脳におけるAβの蓄積を生じる疾患が老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される、（２２）に記載の治療薬、

（２４）　（１）または（２）に記載のタンパク質を含有することを特徴とする、該タンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング用キット、

（２５）　（１）または（２）に記載のタンパク質の基質をさらに含む、（２４）に記載のキット、

（２６）　基質が脳APPである、（２５）に記載の方法、

（２７）　脳におけるAβの蓄積を生じる疾患の検査方法であって、

（ａ）被検者から試料を調製する工程、

（ｂ）該試料に含まれる（１）または（２）に記載のタンパク質の量を（８）に記載の抗体を用いて検出する工程、を含む方法、

（２８）　試料が髄液または血清である、（２７）に記載の方法、

（２９）　脳におけるAβの蓄積を生じる疾患が、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される疾患である、（２７）または（２８）に記載の方法、

（３０）　（８）に記載の抗体を含む、脳におけるAβの蓄積を生じる疾患の検査薬、

（３１）　Aβの蓄積を生じる疾患が、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される疾患である、（３０）に記載の検査薬、を提供するものである。

本発明は、脳で発現し、脳APPに対するペプチダーゼ活性を有する新規な脳カルボキシペプチダーゼB（脳CPB）タンパク質に関する。本発明のタンパク質に含まれるヒト脳CPBタンパク質は、ヒト海馬の抽出物から、脳APPの分解活性を指標にして単離された。また、ヒト脳CPBタンパク質をコードする遺伝子は、ヒト脳CPBタンパク質に対する抗体を用いた免疫学的スクリーニング、およびヒト脳CPBタンパク質の部分アミノ酸配列を基に合成したプライマーを用いたRT-PCRおよびRACEによりクローニングされた。本発明者等により単離されたヒト脳CPBをコードするcDNAの塩基配列を配列番号：1、該cDNAによりコードされるヒト脳CPBタンパク質（プレプロ体）のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。本発明のヒト脳CPBは、プレプロタンパク質として合成されたのち、シグナル配列が切り離されてプロタンパク質が生成し、さらに活性化ペプチドが切り離されて成熟体タンパク質が生成すると考えられる。本発明のヒト脳CPBのプロタンパク質のアミノ酸配列を配列番号：3に、成熟タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：4に示す。本発明において「脳APPとは」、脳で発現するAPP分子種を指す。ヒト脳APPの分子種としては、例えば、APP695（Kang, J. et al. (1987) Nature 325, 733-736）やAppican（Shioi, J. et al. (1992) J. Biol. Chem. 267, 13819-13822）が挙げられるが、これらに制限されない。

ヒト脳CPBは、ヒト脳から調製されたAPPを複数の部位で切断してAβ含有ペプチドを生成する活性を有する。ヒト脳CPBは、40kDaのプレプロタンパク質として合成され、そこから30kDaの成熟タンパク質が生成すると考えられる。アミノ酸配列の特徴から、このタンパク質は、CPBファミリーに属する新規プロテアーゼ（脳カルボキシペプチダーゼB；脳CPB）であることが判明した。このプロテアーゼは、既知のCPBファミリーに属するヒト血漿CPB（HPCPB）と高い相同性を有していたが、特異的なC末端14アミノ酸を有するなどの特定の特徴を有していたことから、血漿CPBが選択的スプライシングを受けたアイソフォームではなく、独立の遺伝子であると推定された。

ヒト脳CPB（HBCPB）は、ノーザン解析では、ヒト臓器のうち、脳のみで発現が認められた。また、ヒト脳CPBのC末端14アミノ酸に対する抗体（抗C14抗体）は、神経細胞体および一部のミクログリアにおいてシグナルが検出されたが（図7）、ヒト血漿CPB（HPCPB）が合成される肝臓では検出されなかった。さらに、脳 mRNA の RT-PCR 解析では、プロセッシングを受けた形態のプレプロヒト脳CPBに特有な1077bpのバンドのみが検出された（図4C）。さらに、抗プレプロヒト脳CPB抗体を用いて行った免疫学的スクリーニングでは、ほとんど同一の制限酵素パターンを有する3つのcDNAクローンが得られたが、このことはヒト脳CPBがヒト脳で発現される唯一のカルボキシペプチダーゼBアイソフォームであることを意味している。

正常脳に関する免疫組織化学分析では、ヒト脳CPBが種々の神経細胞体、特に海馬錐体ニューロンと上衣－脈絡叢細胞、およびミクログリアの内部で発現されているが、アストロサイトでは発現されないことが示された。また、アルツハイマー病患者の脳では、ヒト脳CPBはグリア浸潤を一部は含み、一部は含まない実質沈着としてミクログリアのクラスターの一部で検出された。また、5例のアルツハイマー病患者の脳からの老人斑では、このプロテアーゼに対する免疫反応を示す呈色が一部に認められ、その頻度はそれぞれの脳のすべての斑のうち10～60%の範囲であった。さらに、海馬実質では、ヒト脳CPBおよびC14に対する免疫反応性を示す円形で均質な沈着が5例のアルツハイマー病患者の脳のすべてに共通して認められ、これはアミロイド体とは明らかに異なっていた（図9G）。ミクログリア浸潤の亢進は、加齢脳およびアルツハイマー病患者の脳に共通する所見である。老人斑形成との関連からみたミクログリアの意義は明らかではないが、Wisniewskiら（Wisniewski, H.M. et al.(1989) Can. J. Neurol. Sci., 16, 535-542）は、Aβ沈着の極めて近傍に位置する活性化ミクログリアの小胞体内にAβ線維が存在することを報告しており、このことは活性化されたミクログリアがAβペプチドの合成とともにプロセッシングも行っていることを示唆する。

中胚葉に由来するミクログリア内のAPPアイソフォームにはLAPP、およびKunitzプロテアーゼ阻害性ドメインを有するAPPがあるが、これはいずれもニューロンでは発現されない。別の可能性としては、ミクログリアが初期の斑形成には関与せず、食細胞活動によってAβペプチドのプロセッシングを行うことも考えられる（Frackowiak, J. et al.(1992) Acta Neuropathol., 84, 225-233）。脈絡叢細胞は脳脊髄液（CSF）を分泌し、上衣細胞は分泌、吸収および輸送の機能を果たして脳とCSFとの間の障壁になると推測されている（Del Bigio, M.R. (1995) Glia, 14, 1-13）。これらの細胞内で上記抗C14抗体に対する免疫反応性が発現することから、APPの適切なアイソフォームのような脳細胞内で合成されるペプチドのプロセッシングにはヒト脳CPBが必要なことが示唆される。生理的条件下でニューロン内の標的基質がCSF中に放出される前にプロテアーゼと遭遇する機会は、神経細胞体および上衣細胞内の少なくとも2つ存在していると考えられる。アルツハイマー病では、ミクログリア活性化の亢進に加えて細胞外間質にヒト脳CPBが存在することから病態生理学的異常を呈するものと考えられる。

また、Aβペプチドがヒト脳CPBの基質であることが実験的に確認された。

以上のような所見から、本発明の脳CPBタンパク質は、脳APPの分解によるAβの生成およびアルツハイマー病の発症に深く関与していると考えられる。

すなわち、本発明の脳CPBタンパク質を含むプロテアーゼの作用バランスの失調が、Aβの異常蓄積をもたらしていることが示唆される。

本発明のヒト脳CPBは、脳内に蓄積している自己凝集性の高いβアミロイドペプチド（特にβアミロイド1-42）の代謝・低下作用により神経細胞死を減少させる機能をもち得る。

本発明の脳CPBタンパク質は、Aβの生成の分子メカニズムを解明する研究対象としての利用の他、それ自体医薬品として利用することができる。例えば、アルツハイマー病患者の脳脊髄液中への持続注入し、 髄液中でのヒト脳CPB濃度を上昇させることにより、上衣細胞を介して神経細胞への取り込みを促し、減

少・枯渇しているヒト脳CPBを補い、Aβ代謝を改善させることが可能であると考えられる。

また、本発明の脳CPBは、医薬品として有用な本発明のタンパク質の促進剤や阻害剤のスクリーニングのためのツールとして利用することができる。さらに、本発明のタンパク質または本発明のタンパク質の活性を制御する化合物は、脳におけるAβペプチドの蓄積を来す病態を含む種々の疾患における予防や治療のための医薬として、また、それら疾患の検査や診断のための薬剤として有用である。このような疾患としては、例えば、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血（オランダ型等）、頭部打撲（ボクサー脳）などが挙げられる。

本発明においては、脳APPに対するペプチダーゼ活性を有する限り、天然型ヒト脳CPBタンパク質（配列番号：2、3、4）と構造的に類似したタンパク質も含まれる。このような構造的に類似したタンパク質には、天然型ヒト脳CPBタンパク質の変異体や他の生物由来の脳CPBタンパク質が含まれる。

このようなタンパク質は、当業者であれば、例えば、公知の変異導入法を用いて調製することができる。当業者に公知のタンパク質中のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、Kunkel法（Kunkel, T.A. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 488; Kunkel, T.A. et al. (1987) Methods in Enzymology 154, 367）、Gapped duplex法（Kramer, W. et al. (1984) Nucl. Acids. Res. 12, 9441; Kramer, W. et al. (1987) Methods in Enzymology 154, 350）、Oligonucleotide-directed Dual Amber (ODA) 法（Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275; Zoller, M.J. and Smith, M. (1983) Methods in Enzymology 100, 468）などが挙げられる。タンパク質におけるアミノ酸の改変は、人為的に行うのであれば、通常、30アミノ酸以内、好ましくは10アミノ酸以内、さらに好ましくは5アミノ酸以内である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このように脳APPに対するペプチダーゼ活性を有する限り、人為的なまたは自然界におけるアミノ酸の置換、欠失、付加、および/または挿

入により天然型ヒト脳CPBタンパク質（配列番号：2、3、4）に対してアミノ酸配列が異なるタンパク質も、本発明に含まれる。

置換されるアミノ酸は、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましいと考えられる。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trpは、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Glnが挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが挙げられる。また、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、Hisが挙げられる。

また、脳APPに対するペプチダーゼ活性を有する、ヒト脳CPBタンパク質と構造的に類似したタンパク質の調製は、公知のハイブリダイゼーション技術（2.9 Southern Blotting and Hybridization 2.9.1-2.9.10 (Selden, R.F.), 4.9 Analysis of RNA by Northern Hybridization 4.9.1-4.9.8 (Selden, R.F.), 6.3 Hybridization with Radioactive Probes Using DNA Fragments 6.3.1-6.3.6 (Straus, W.M.), 6.4 Hybridization with Radioactive Probes Using Oligonucleotides 6.4.1-6.4.5 (Duby, A.), in 'Current Protocols in Molecular Biology' (Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. eds.) John Wiley & Sons, New York (1987)）やポリメラーゼ連鎖反応技術（Optimization of PCRs 3-12 (Innis, M.A. and Gelfand, D.H.), Amplification of Genomic DNA 13-20 (Saiki, R.K.), Amplification of RNA 21-27 (Kawasaki, E.S.), RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends 28-38 (Frohman, M.A.), Degenerate Primers for DNA Amplification 39-45 (Compton, T), cDNA Cloning Using Degenerate Primers 46-53 (Lee, C.C. and Caskey, T.), in 'PCR Protocols' (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. eds.) Academic Press, San Diego (1990)）を利用して行うことができる。即ち、当業者においては、「ヒト脳CPB」cDNA配列（配列番号：1）若しくはその一部をプローブとして、また、「ヒト脳CPB」cDNA（配列番

号：1）に特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドをプライマーとして、種々の他の生物から「ヒト脳 CPB」cDNA と相同性の高い DNA を単離し、さらに単離した DNA から「ヒト脳 CPB」タンパク質と構造的に類似したタンパク質を得ることが常套手段となっている。

本発明においては、脳 APP に対するペプチダーゼ活性を有する限り、「ヒト脳 CPB」cDNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質を包含する。このようなタンパク質を単離する他の生物としては、例えば、サル、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウシ、ヒツジ、ブタ、イヌなどが挙げられるが、これらに制限されない。このようなタンパク質をコードする cDNA を単離するには、例えば、これら生物の脳、例えば、海馬が材料として適していると考えられる。

ヒト以外の生物に由来する「脳 CPB」タンパク質をコードする DNA は、通常、「ヒト脳 CPB」と高い相同性を有する。高い相同性とは、アミノ酸レベルで少なくとも 40%以上、好ましくは 55%以上、さらに好ましくは 70%以上（例えば、85%以上、90%以上、95%以上）の配列の同一性を指す。配列の相同性は、日本データバンク：DDBJ（国立遺伝学研究所）のホモロジーサーチプログラム、例えば FASTA、BLAST 等により決定することができる。

ヒト「脳 CPB」タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードする DNA を単離するためのハイブリダイゼーションの条件としては、当業者であれば適宜選択することができる。例えば ^{32}P ラベルしたプローブを用いて脳 cDNA ライブラリーから単離する場合の一例を示せば、ハイブリダイゼーション後の洗浄を、55℃，2×SSC，0.1%SDS の低ストリンジェントな条件で行う。より好ましくは、55℃，0.2×SSC，0.1%SDS の中程度のストリンジェントの条件で行う。さらに好ましくは 68℃，0.2×SSC，0.1%SDS の高ストリンジェントな条件で行う。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。他組織から単離する場

合には、類似の CPB が発現している可能性が考えられるため、高ストリンジェントな条件で洗浄を行うことが好ましい。

本発明のタンパク質は、天然のタンパク質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。天然のタンパク質は、例えば、「脳 CPB」タンパク質が発現していると考えられる組織（例えば、海馬など）の抽出液に対し、後述する「脳 CPB」タンパク質に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行う方法により調製することが可能である。また、実施例に記載したように、ベンズアミジン-セファロースカラムに結合した画分を回収し、調製用 PAGE などを適宜組み合わせることによって調製することができる。一方、組換えタンパク質は、後述するように「脳 CPB」タンパク質をコードする DNA で形質転換した細胞を培養し、これらタンパク質を発現させ回収することにより調製することが可能である。

本発明は、また、本発明のタンパク質の部分ペプチドを包含する。本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のタンパク質のうち、活性化ペプチドと成熟タンパク質との境界部分を含むペプチドが挙げられる。このようなペプチドは、プロタンパク質から成熟タンパク質が切り出される反応を媒介するプロテアーゼに作用し、本発明のタンパク質の成熟体の生成と拮抗すると考えられる。また、本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、本発明のタンパク質の基質との結合部位に相当するペプチドが挙げられる。このような部分ペプチドは、生体投与することで、本発明のタンパク質の阻害剤等としての利用が考えられる。これら部分ペプチドは、本発明のタンパク質を介したシグナル伝達の阻害剤や活性化剤として有用である。また、本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のタンパク質（例えば、配列番号２、３、４）のＣ末端領域の部分ペプチドが挙げられ、該ペプチドは抗体の調製に利用することができる。また、本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、活性化ペプチドが挙げられる。本発明のタンパク質に特異的なアミノ酸配列を有する部分ポリペプチドは、少なくと

も7アミノ酸、好ましくは少なくとも8アミノ酸、さらに好ましくは少なくとも9アミノ酸の鎖長を有すると考えられる。本発明の部分ペプチドは、例えば、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

また、本発明は、本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のタンパク質をコードするDNAとしては、これらタンパク質をコードしうるものであれば特に制限はなく、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAが含まれる。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

本発明のタンパク質をコードするcDNAは、例えば、配列番号：1に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを^{32}Pなどで標識し、本発明のタンパク質が発現している組織（例えば海馬など）由来のcDNAライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、適当な組織（例えば海馬など）由来のcDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。ゲノムDNAは、例えば、配列番号：1に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを^{32}Pなどで標識し、ゲノムDNAライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、ゲノムDNAを鋳型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。一方、合成DNAは、例えば、配列番号：1に記載のcDNAの部分配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成し、アニーリングさせて二本鎖にし、DNAリガーゼで結合させることにより調製することができる。

これらDNAは、組換えタンパク質の生産に有用である。即ち、本発明のタンパク質は、それをコードするDNA（例えば、配列番号：1に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、当該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を該形質転換体またはその培養上清から生成することにより、組換えタンパク質として調製することが可能である。

例えば、大腸菌を宿主として組換えタンパク質を発現させる場合には、T7 RNAポリメラーゼにより発現が誘導され、種々のタグを付加することが可能なpET System（Novagen社）、本発明のタンパク質をセルロース結合ドメインとの融合タンパク質として発現させ、セルロース担体でアフィニティー精製することが可能なpET CBD Fusion System 34b-38b（Novagen社）、本発明のタンパク質をグルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合タンパク質として発現させ、グルタチオンセファロース4Bにより精製することが可能なGST Gene Fusion System（Pharmacia社）などを用いることができる。また、本発明のタンパク質を発現させるための宿主には制限はなく、公知のベクター系を用いて酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞などで発現させることが可能である。神経細胞（ニューロン）での発現の目的から、例えば、Semliki Forest Virus (SFV)ベクターを用いるシステム（Tienari, P.J. et al., EMBO J. 15: 5218-5229 (1996)等）を用いることができる。

宿主細胞において発現させた組換えタンパク質は、公知の方法により精製することができる。また、本発明のタンパク質を、例えば、N末端にヒスチジン残基のタグ、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）などを結合した融合タンパク質の形で発現させた場合には、ニッケルカラムやグルタチオンセファロースカラム等により精製することができる。また、本発明のタンパク質を融合タンパク質として発現させた場合には、その境界部位にスロンビン（Thrombin）やFactor Xa等の切断部位を挿入しておくことにより、本発明のタンパク質部分を回収することが可能である。

本発明のタンパク質をコードするDNAまたはそのアンチセンスDNA等は、また、本発明のタンパク質の異常（発現異常や機能異常）に起因する疾患の遺伝子治療に応用することも可能である。遺伝子治療に用いるためのベクターとしては、ベクターから治療上有効な発現が得られる限り制限はないが、例えば、アデノウイルスベクターやセムリキ森林ウイルスベクターが挙げられる（Chen, J. et al. (1998) Cancer Res. 58, 3504-3507; Barkats, M. et al. (1998) Progress in Neurobiology 55, 333-341）。

例えば、プレプロヒト脳CPB-cDNAをセムリキ森林ウイルスベクター（pSFV-1）にフレームを合わせて組み込んだベクターを作成後、ヘルパーウイルスを用いて遺伝子組み換えウイルスを完成させ、全身状態やウイルス抗体値等により治療に適切な患者を選択し、該患者に対して遺伝子治療を行うことが考えられる。

本発明はまた、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するポリヌクレオチドに関する。該ポリヌクレオチドは、好ましくは、配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNAまたはその相補鎖と特異的にハイブリダイズするものである。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくは本明細書において上記したストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなポリヌクレオチドには、本発明のタンパク質をコードするDNA又は該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし得るプローブやプライマー、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等）が含まれる。

本発明のタンパク質をコードするcDNAあるいはその配列の一部を含むオリゴヌクレオチドは、本発明のタンパク質をコードする遺伝子やcDNAのクローニング、あるいPCRによる増幅に利用できる。さらに、制限断片長多型（RFLP）、1

本鎖DNA高次構造多型（SSCP）などの方法により、遺伝子あるいはcDNAの多型あるいは異常の検出(遺伝子診断など）に利用できる。

また、本発明は、本発明のタンパク質に結合する抗体に関する。本発明のタンパク質に対する抗体は、公知の方法により作製することが可能である（Scheidtmann, K.H., Immunological detection of known sequence, in "Protein structure", T.E. Creighton ed., IRL Press, Oxford University Press, pp. 93-115）。ポリクローナル抗体の調製は、例えば、海馬組織より調製した天然由来の本発明のタンパク質または組換えタンパク質を、アジュバントと共に、ウサギ、モルモット、ヤギ等の動物に免疫する。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることができる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得られる。この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。抗原として、本発明のタンパク質の部分ペプチドを用いることも可能である。一方、モノクローナル抗体の調製は、例えば、本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドを、上記と同様に免疫動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製により行うことができる。

これにより調製された抗体は、本発明のタンパク質のアフィニティー精製のために用いられる他、例えば、本発明のタンパク質の発現異常や構造異常に起因す

る疾患の検査や診断、本発明のタンパク質の発現量の検出などに利用することが可能である。

実施例に示されたように、アルツハイマー病において、本発明のタンパク質の発現の低下、および間質への沈着が認められる。本発明のタンパク質は、髄液および血清中に検出されることから、これらの試料に含まれる本発明のタンパク質の検出により、脳においてAβの蓄積を生じる疾患の検査・診断を行なうことが可能である。このような病態診断薬として、本発明のタンパク質に対する抗体は有用である。

本発明の抗体を用いる脳におけるAβの蓄積を生じる疾患の検査は、（ａ）被検者から試料を調製する工程、（ｂ）該試料に含まれる本発明のタンパク質の量を該タンパク質に対する抗体を用いて検出する工程、を含む方法により実施することができる。本発明の検査の対象となる疾患としては、脳におけるAβの蓄積を生じる疾患であれば制限はなく、例えば、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲が挙げられる。検査のために被験者から調製する試料としては、髄液または血清が好適である。

試料中に含まれる本発明のタンパク質は、例えば、ウェスタンブロッティング、免疫沈降、ELISA等の方法で検出することが可能である。検出に用いられる抗体としては、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよい。抗体を検査薬として用いる場合、pH緩衝液（例えばリン酸緩衝液、HEPES緩衝液など）を用い、担体（例えば牛血清アルブミンまたはゼラチンなど）、防腐剤（アジ化ナトリウム）等を必要に応じて混合してもよい。

この検出の結果、健常者と比較して、被検者試料中の抗体反応性タンパク質量の増加もしくは減少、抗体反応性タンパク質の分子量の異常、および／または各分子量のタンパク質の量比の異常が認められれば、該被検者は、上記疾患にかかっているか、または上記疾患のおそれがある判定される。この検査は簡便であり

被検者への負担も少ないことから、CNSの病態を検査・診断するための優れた方法である。

また、本発明の抗体を抗体治療に用いることも考えられる。抗体治療に用いる場合、ヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。このような抗体は、公知の方法により調製することができる（Parren, P.W. (1992) Hum. Antibodies Hybridomas 3, 137-145）。

本発明は、また、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法に関する。本発明のスクリーニング法は、（ａ）本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、（ｂ）本発明のタンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、および（ｃ）本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む。

スクリーニングに用いる被検試料としては、これらに制限されないが、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、合成ペプチド、修飾ペプチド、天然化合物などが挙げられる。スクリーニングに用いる被検試料は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。

本発明のタンパク質と結合するタンパク質のスクリーニングは、例えば、本発明のタンパク質のＣ末端14アミノ酸（C14）のオリゴペプチド等を固定したアフィニティーカラムに本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞の培養上清もしくは細胞抽出物をのせ、カラムに特異的に結合するタンパク質を精製することにより、本発明のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニングを実施することが可能である。また、本発明のタンパク質と結合するタンパク質やその遺伝子のスクリーニングは、例えば、ウエストウエスタンブロッテイング法（Tarassishin, L.A. and Russell, W.C. (1997) Biochemistry (Mosc.) 62, 38-40; Matthews, D.A. and Russell, W.C. (1998) J. Ge

n. Viol. 79, 1671-1675) やtwoハイブリッドシステム (Vidal, M. (1997) The Reverse Two-Hybrid System in "The Yeast Two-Hybrid System" (Bartel, P. and Fields, S. eds.) Oxford University Press, New York; Fields, S. and Song, O.K. (1995) Microbiology Rev. 59, 94; Vidal, M. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10321) を利用して行うことも可能である。コンビナトリアルケミストリー技術 (Myers, P.L. (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8, 701-707; Campbell, D.B. (1997) Q. J. Nucl. Med. 41, 163-169) 等によるハイスループットを用いたスクリーニング (Cerretani, M. et al. (1999) Anal. Biochem. 266, 192-197; Kenny, B.A. et al. (1998) Prog. Drug. Res. 51, 245-269; Gonzalez, J.E. and Negulescu, P.A. (1998) Curr. Opin. Biotechnol. 9, 624-631) により本発明のタンパク質に結合する化合物を単離する方法も当業者に周知の技術である。

また、本発明は、本発明のタンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法に関する。この方法は、本発明のタンパク質によるその基質の切断活性を指標とする方法であり、具体的には、（ａ）被検試料の存在下で、本発明のタンパク質にその基質を接触させる工程、（ｂ）該基質の切断を検出する工程、および（ｃ）被検試料非存在下において検出した場合（対照）比較して、本発明のタンパク質により引き起こされる該基質の切断を増加または減少させる活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法である。

スクリーニングに用いる被検試料としては、例えば、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成低分子化合物、タンパク質、天然または合成ペプチド、天然化合物、血清などが挙げられるが、これらに制限されない。また、本発明のタンパク質との結合活性を指標とした上記のスクリーニングにより単離された化合物を被検試料として用いることも可能である。スクリーニングに用いる本発明のタンパク質としては、天然のタンパク質でも組換えタンパク質でもよい。

基質としては、脳APPが好適である。天然型脳APPは、実施例に記載の方法で調製することが可能である。また、本発明のタンパク質が切断活性を示しうる限り、脳APPの部分ペプチドや、他のAPPアイソフォームやAPP類似ポリペプチド、基質の切断部位を含むように合成されたオリゴペプチドを用いてもよい。

基質の切断は、例えば基質と本発明のタンパク質をインキュベート後、SDS-PAGEを行い、基質に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出することが可能である。または、基質として合成オリゴペプチドを用いる場合は、あらかじめN端またはC端等を標識しておき、Tris-tricine型PAGEまたは薄層クロマトグラフィー（TLC）などにより検出することもできる。または、基質ペプチドの一端をマイクロプレート等の支持体に固定化し、他端を標識しておけば、基質の切断をより簡便に検出することが可能である。

被検試料非存在下と比較して、被検試料存在下において、本発明のタンパク質による基質の切断が促進されれば、その化合物は、本発明のタンパク質による基質の切断活性を促進する化合物と判定される。逆に被検試料存在下において、本発明のタンパク質による基質の切断が阻害されれば、その化合物は、本発明のタンパク質による基質の切断活性を阻害する化合物と判定される。本発明において「基質の切断活性を阻害する」とは、切断活性を完全に阻害する場合および部分的に阻害する場合を含む。

なお、本発明のタンパク質による基質の切断部位を決定するには、例えば、まず、本発明のタンパク質と脳APPとをインキュベートし、切断された脳APPをSDS-PAGEで分離後、APPのドメイン特異的抗体(例えばAβについてはAβ1-17抗体、Aβ17-24抗体、Aβ1-40 C端抗体、Aβ1-42 C端抗体等）を用いてウェスタンブロッティングを行い、切断部位を推定する。次に、よりスケールアップした系で本発明のタンパク質により切断された基質断片を精製し、N端またはC端のアミノ酸シーケンシングを行うことにより、切断部位を同定することができる。または、基質として合成オリゴペプチド（例えばAβ1-42等）を用い、本発明の

タンパク質とインキュベート後、C端から分解された遊離アミノ酸をアミノ酸分析器により定性・定量的に測定し、切断部位を推定することができる。

本発明のタンパク質や本発明のスクリーニング方法により単離される化合物は、例えば、Aβの生成を調節するための薬剤として、また、本発明のタンパク質が関与する脳疾患（例えば、アルツハイマー病などのAβの蓄積を生じる疾患）の予防薬や治療薬への応用が考えられる。

本発明のタンパク質や本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を医薬として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

また、本発明は、本発明のタンパク質を含有することを特徴とする、該タンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング用キットに関する。本発明のキットにおける本発明のタンパク質は、例えば、精製または粗精製タンパク質、所望の細胞（該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む）内または細胞外に発現した形態、または支持体に結合した形態であってもよい。本発明のキットの他の要素としては、上記タンパク質標品以外に基質を含むことが好ましい。基質としては、本発明のタンパク質が切断活性を示し

うる限り制限はないが、脳APPが好適である。天然型脳APPは、実施例に記載の方法で調製することが可能である。また、脳APPの部分ペプチドや、他のAPPアイソフォームやAPP類似ポリペプチド、基質の切断部位を含むように合成されたオリゴペプチドを基質として含んでもよい。基質は標識されていてもよい。さらに、本発明のタンパク質と基質との反応のための緩衝液、洗浄液、基質の切断を検出するための試薬などが含まれていてもよい。

図面の簡単な説明

図1は、ヒト海馬ホモジネートのAPP分解活性を示す写真である。(A)ベンズアミジン-セファロース6BアフィニティカラムとAPPと結合した画分の未変性PAGEプロフィール。クーマシーブリリアントブルー染色。左：分子量マーカーの移動位置をキロドルトン単位で示したもの。220kDa：ミオシン、97kDa：ホスホリラーゼb、67kDa：ウシ血清アルブミン、46kDa：卵白アルブミン、30kDa：脱炭酸酵素、21kDa：トリプシン阻害因子。(B)調製用未変性PAGEによって分画したタンパク質のSDS-PAGE解析。平行ウェルには3つの連続した画分のうち1つずつを並べて泳動し、分離した後に銀染色によって可視化した。(C)未変性PAGEによって分離した画分19のMono Sイオン交換クロマトグラフィー。縦軸：280nmでの光学濃度（OD）。横軸：画分をml単位で示したもの。矢印は溶出緩衝液を加えた画分の位置を示す。

図2は、精製した40kDaタンパク質の脳APP分解活性を示す写真である。約0.1pmolの天然型APP（レーン3を除く）またはコンドロイチナーゼABC（CDR-ABC）で前処理したAPP（レーン3）を、1mM EDTA（レーン2）または1mMジャガイモカルボキシペプチダーゼ阻害因子（CPI）（レーン4）の存在下または非存在下で、40kDaプロテアーゼ（レーン2、3、4、6、7、8、9および10では約0.05pmol、レーン5では約0.01pmol）で処理した。また抗40kDaプロテアーゼ抗体（レーン9）あるいは抗C14抗体（レーン10）に共存下（容量比で1/50）でも

解析した。Tris-トリシン SDS-PAGE の後、レーン 1 から 6 までに対応するブロットには抗 Aβ1/14 抗体、レーン 7 および 10 に対応するブロットには抗 APP-CT 抗体を用いて解析した。左：分子量マーカーの移動位置をキロドルトン単位で示したもの。46kDa：卵白アルブミン、21kDa：トリプシン阻害因子、14kDa：α-ラクトアルブミン、6.5kDa：ミオグロビン II、3.4kDa：ミオグロビン I。矢印は 5.5 kDa の Aβペプチドの移動位置を示す。

図３は、プレプロヒト脳 CPB cDNA の塩基配列および予想されるアミノ酸配列。左の数字は cDNA のヌクレオチド残基を示し、右の数字は予想されるアミノ酸残基を示す。矢尻は疎水性シグナル（22 アミノ酸残基）の切断部位、および活性化ペプチド（92 アミノ酸残基）がプレプロ酵素から放出されると予想される切断部位を示す。30kDa タンパク質（成熟型酵素）中に同定されたアミノ酸配列には下線を施した。停止コドンおよびポリアデニル化シグナルには二重下線を施した。N 結合グリコシル化部位はアスパラギン残基の下に●印を付した。組織 CPB および HPCPB に関して、亜鉛結合にかかわると予想されるアミノ酸残基（円で囲んだアミノ酸残基）および基質結合にかかわると予想されるアミノ酸残基（四角で囲んだアミノ酸残基）を示した。以上の配列データは DDBJ／EMBL／GenBank データベースにアクセッション番号 AB011969 として寄託されている。

図４は、プレプロヒト脳 CPB の分子的特徴の決定。(A)プレプロヒト脳 CPB およびプレプロ HPCPB の構造を比較した模式図。(B)ヒト脳 CPB に特有な C 末端 14 アミノ酸残基をコンピューター検索による相同ペプチドとともに併置したもの。同一のアミノ酸を囲って示した。(C)ヒト脳 CPB に関するヒト海馬 RNA の RT-PCR 解析を示す写真。DNA 分子量マーカーの移動位置を bp 単位で示した。矢尻は合成ヒト脳 CPB cDNA（左）の 1077bp バンドおよびヒト脳 CPB cDNA の 3' 末端部分に対応する 538bp バンド（右）の移動位置を示す。

図５は、種々の臓器由来のヒト mRNA のノーザンブロット解析を示す写真である。ヒト脳（海馬）（レーン 1）、心臓（レーン 2）、胎盤（レーン 3）、膵臓

（レーン4）、腎臓（レーン5）、肝臓（レーン6）および脾臓（レーン7）由来の全RNA 20μgから調製したポリ(A)$^+$RNAを、2回に分けて（AおよびB）変性アガロースゲルに並べて泳動した。(A)^{32}Pで標識したプレプロヒト脳CPB cDNAの538bp断片をプローブに用いたオートラジオグラム。(B)^{32}Pで標識したβ-アクチンcDNAプローブを用いたオートラジオグラム。左：RNA分子量マーカーの移動位置をkb単位で示したもの。矢尻は1.8kbのプレプロHPCPB mRNA、ならびに1.5kbのプレプロヒト脳CPB mRNA（A）および2.0kbのヒトβ-アクチンmRNA（B）の移動位置を示す。

図6は、プレプロHPCPBに対するポリクローナル抗体の調製およびウエスタンブロット解析を示す写真である。(A)ベンズアミジン-セファロースと結合した画分のSDS-PAGEプロフィール。左：図1Aと同じ分子量マーカーの移動位置。矢尻：40kDaプロテアーゼの移動位置。(B)未変性PAGEによって分離した画分を抗体用いてウエスタンブロット解析した結果である。画分17～21（レーン1～5）をSDS-PAGEによって分離した。左の数字および矢尻はAと同じである。(C)抗プレプロヒト脳CPB抗体（レーン1～4）または抗C14抗体（レーン5～7）を用いた海馬ホモジネートのウエスタンブロット解析。左の数字および矢印はAと同じである。矢尻は40kDaプロテアーゼ（大きな矢尻）および30kDa成熟型（小さな矢尻）の移動位置を示す。

図7は、ヒト正常脳切片の免疫組織化学分析を示す写真である。用いた抗体は抗プレプロヒト脳CPB抗体（A、B、C、FおよびI）または抗C14抗体（D、E、GおよびH）である。(A)海馬の全体像。錐体ニューロンはすべて免疫反応性を示す。倍率5倍。(B)海馬実質における錐体ニューロンおよび活性化ミクログリアでは細胞質に免疫反応性が認められる。倍率400倍。(C)錐体ニューロンに接着した活性化ミクログリア。倍率600倍。(D)錐体ニューロンの細胞体には顆粒状の抗C14免疫反応性が認められる。倍率400倍。(E)外側膝状体の血管周囲に位置する活性化ミクログリア。倍率400倍。(F)および(G)外側膝状体ニューロンは

抗ヒト脳CPB（F）および抗C14（G）免疫反応性を示す。倍率400倍。(H)上衣細胞の細胞質における抗C14免疫活性。倍率200倍。(I)脈絡叢細胞の細胞質における抗プレプロヒト脳CPB免疫反応性。倍率200倍。

図８は、免疫蛍光共焦点レーザー顕微鏡観察を示す写真である。海馬の錐体ニューロン（A、B、C、G、H、I、J、KおよびL）および外側膝状体ニューロン（D、EおよびF）の脳切片に、抗ニューロフィラメント抗体（FITC、緑色）と抗プレプロヒト脳CPB抗体（テキサスレッド、赤色）（A、B、C、G、HおよびI）、抗ニューロフィラメント抗体（FITC）と抗C14抗体（テキサスレッド）（D、EおよびF）、または抗Aβ1／40抗体（FITC）と抗C14抗体（テキサスレッド）（J、KおよびL）の組み合わせによる二重染色を施した。C、F、IおよびLの顕微鏡写真では、2つの免疫反応性が融合した像（黄色）が認められる。倍率：200倍（J、KおよびL）、400倍（J、KおよびLを除くすべて）。

図９は、孤発性アルツハイマー病患者の脳切片の免疫組織化学分析を示す写真である。(A)：海馬の錐体ニューロン。一部のニューロンでは抗プレプロヒト脳CPB免疫反応性の低下が認められる。倍率400倍。(BおよびC)：海馬内にグリア浸潤を伴う(B)または伴わない(C)、抗C14免疫反応性の細胞外沈着。倍率400倍。(DおよびE)：抗CD68抗体（C）および抗C14抗体（D）で染色した2枚の連続切片。海馬内のCD68陽性ミクログリアの一部は抗C14免疫反応性も呈する。倍率200倍。(F)：活性化ミクログリアのクラスターは海馬内でプレプロヒト脳CPB免疫反応性を示す。倍率200倍。(G)：アミロイド体は抗C14免疫反応性を発現しない。倍率200倍。

図１０は、ラット精巣の免疫組織化学分析を示す写真である。間質のラディッヒ細胞の細胞質が抗C14モジュール抗体（ヒト脳CPBのC末端部分を認識する）で濃く染色されている。上が200倍、下が400倍の写真である。

発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[実施例１] 海馬ホモジネートからの40kDaプロテアーゼの調製、およびAPPタンパク質分解の解析

神経疾患以外の疾患で死亡した患者5例（55～82歳）および孤発性アルツハイマー病で死亡した5例（60～84歳）の合計10例の脳標本を剖検時に死後5時間以内に採取した。側頭葉切片を作製し、液体窒素中にて凍結し、-110℃で保存した。ホモジネートの調製には、凍結標本から海馬領域（約4g）を摘出し、続いて50mM Tris-HCl (pH7.5) ／1mM EDTA／2mMフェニルメタンスルホニルフルオリドからなる滅菌ホモジナイズ用緩衝液15ml中にて解凍し、その後、Dounceホモジナイザーにて氷上でホモジナイズした。ホモジネートは39,000g、30分間で遠心分離を行った。上清を40%硫酸アンモニウムで沈殿させ、沈殿物を氷冷したホモジナイズ用緩衝液に対して透析した。この透析物を海馬ホモジネートとして用いた。天然型脳APPは、記載されている通り（Matsumoto, A. and Fujiwara, Y. (1993) Eur. J. Biochem., 217, 21-27）に、抗cAPP抗体（Matsumoto, A. and Fujiwara, Y. (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 175, 361-365）を用いたホモジネートの免疫沈降によって調製した。海馬ホモジネート（1回の調製当たり約10mg）を、平衡化緩衝液として20mM Tris-HCl (pH7.5) を用いて、広範囲のセリンプロテアーゼを捕捉するベンズアミジン-セファロースTM6Bアフィニティカラム（Amersham Pharmacia、UK）によるクロマトグラフにかけた。通過画分を回収した後、溶出物の280nmでの光学濃度がベースライン値に達するまでカラムを平衡化緩衝液で激しく洗浄した。カラムと結合した画分を、20mM Tris-HCl (pH7.5) および0.2M NaClからなる溶出緩衝液を用いて回収し、次いで氷冷した10mM Tris-HCl (pH7.5) に対して透析した上で凍結乾燥した。クーマシーブリリアントブルー染色による全結合画分の未変性PAGEプロフィールを図1Aに示す。

タンパク質分解活性を損なわずに結合画分を分離するため、SDSを用いずに未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。未変性PAGEには、液相回収装置（Biophoresis™ 3、Atto、Japan）を備えた調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動装置およびTris-グリシン緩衝系を用いた（Smith, J.A. (1989) Electrophoretic separation of proteins. In Ausubel, F.M. et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology., John Wiley and Sons,New York, USA, pp.10.2.1-10.2.9）。約3mgの結合画分を未変性PAGEにより分子量20～100kDaの範囲の61画分に分離した。各画分の一部をSDS-PAGEに供し、銀染色によって可視化した（図1B）。

各画分を天然型脳APP分解活性に関して分析するため、まず、1mM Zn^{2+}の存在下にて、ヒト海馬から調製した約0.1pmolの天然型脳APPを各画分（約0.05pmol）とともに37℃で3時間インキュベートした。続いて、目的とするタンパク質分解活性を得るため、各反応混合物をSDS-PAGE用のウェルに並べて泳動し、抗Aβ1/14抗体（Calbiochem）を用いたウエスタンブロット解析を以下のようにして行った。

SDS-PAGEによるタンパク質分離後にタンパク質をゲルからHybond Cニトロセルロース膜（Amersham Pharmacia、UK）にブロットし、その後で5%ウシ血清アルブミンを含むTris緩衝生理食塩水（100mM Tris-HCl（pH7.5）、140mM NaClおよび0.1%Tween 20）中に膜を1時間浸漬することにより、非特異的結合をブロックした。次に上記の緩衝液を3回交換しながら膜を45分間洗浄し、引き続いてTris緩衝生理食塩水で適度に希釈した一次抗体（抗Aβ1/14抗体）とともに4℃で16時間インキュベートした。これを上記の通りに再び洗浄した後、1：2000に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ二次抗体とともに膜を室温で1時間インキュベートした。洗浄後、ECL化学発光検出システム（Amersham Pharmacia、UK）を用いて、シグナルをX線フィルムで検出した。

解析した61画分のうち、分子量約40kDaを含む画分19と分子量約30kDaを含む画分11に同程度のタンパク質分解活性が認められた。解析の結果、画分19のタンパク質成分には均質性がなく、画分11の成分は均質であったが室温では30分以内に活性が消失し、-20℃での長期保存（2週間）によっても活性が消失した。このため、タンパク質分解活性を有する分子量40kDaを含む画分19をさらに精製することにした。

合計5回の調製用電気泳動により充分量の画分19を回収した（図1B）。画分19（約8μg）を均質化するため、20mM Tris-HCl（pH7.5）を平衡化緩衝液とする1mM Mono Sイオン交換カラムにかけた。洗浄後、20mM Tris-HCl（pH7.5）／0.2M NaClを溶出緩衝液として結合画分を回収した。この結果、画分19からは40kDaタンパク質分解活性がカラム中に捕捉され、溶出によって回収されたが、共に挙動していた他のタンパク質はそのまま通過した（図1C）。続いてこれに上記の通りに透析および凍結乾燥を行い、ヒト脳CPB（HBCPB）標品を得た。ベンズアミジン-セファロースカラムに結合した画分（約15mg）からのヒト脳CPBの回収量は2μgであった（約5pmol）。

単離した40kDaプロテアーゼのタンパク質分解活性を解析するため、1mM Zn^{2+}の存在下にて37℃で3時間、脳APP基質（約0.1pmol）を40kDaプロテアーゼ（0.005～0.1pmol）と共にインキュベートし、反応産物の解析は抗Aβ1／14抗体を用いたウエスタンブロッティングによって解析した（図2）。以上の反応条件下で40kDaタンパク質は天然型脳APPを分解し、5.5kDa断片を主成分とする3～11kDaのAβ含有ペプチドを生成した（図2、レーン5および6）。同様の反応を、5mM EDTA、または1mMジャガイモカルボキシペプチダーゼ阻害因子（BioPur、Switzerland）の存在下で行ったところ、EDTA（図2、レーン2）およびジャガイモカルボキシペプチダーゼ阻害因子（図2、レーン4）によって反応は完全に阻害された。コンドロイチナーゼABC処理の効果を検証するため、まずコンドロイチナーゼABCの酵素活性を阻害するZn^{2+}を含まない条件下において、20mM Tris

-HCl（pH7.0）中にて0.1pmolの天然型脳APP（を0.5pmolのプロテアーゼ非含有コンドロイチナーゼABC（Seikagaku, Japan）とともに37℃で3時間インキュベートし、その後、反応混合物を65℃で15分間インキュベートして酵素を変性させた後、上記と同様にタンパク質分解反応を行った。その結果、反応はほぼ完全に阻害されることが判明した（図2、レーン3）。また、APPの細胞質ドメインの一部に対応するオリゴペプチドNH_2-TPEERHLSKMQQNGYENPTYKFFE-COOH（配列番号：5）（APP695の668～691番目のアミノ酸）に対して産生させた抗APP-CT抗体を用いてウエスタンブロット解析を行ったところ、5.5kDa断片が主要な切断産物として検出された（図2、レーン8）。また、抗40kDaプロテアーゼ抗体あるいは抗C14抗体の存在下（反応混合液の1/50の容量）では、このプロテオリシスは完全に阻害された(図2、レーン9 および10）。

抗Aβ1/14抗体、抗APP-CT抗体のいずれを用いても脳APPからの主要な分解産物として5.5kDa断片が検出された（図2）ことは、この断片がAβのN末端の近傍と、膜貫通部分の近傍にあるAPP細胞質ドメインにおける切断によって生成され、ほぼ完全なAβにわたっていることを示唆している。ヒト脳CPBにはAβの15～17番目のアミノ酸残基を切断するαセクレターゼ様活性はなく、このため抗APP-CTドメインを有するC末端APP断片はないと考えられる。

［実施例２］ 40kDaプロテアーゼをコードするcDNAの分子クローニングおよび構造解析

N末端アミノ酸配列決定に基づいて合成したオリゴヌクレオチドによる海馬cDNAライブラリーのスクリーニングによってcDNAクローンを単離するために、40kDaおよび30kDaタンパク質のそれぞれをImmobilon P^{SQ}フィルター（Millipore, USA）上に固定し、続いてエドマン分解を行った。40kDaタンパク質のミクロシークエンシング分析は成功しなかったが、これはN末端がブロックされていたためと考えられる。30kDaタンパク質のシークエンシングの結果を表1に示す。表は、各サイクルにおける各アミノ酸残基の収量をpmol単位で示した。最も多

量に回収されたアミノ酸に下線を施した。各アミノ酸残基は以下の通りに略記した。D：アスパラギン酸、E：グルタミン酸、N：アスパラギン、S：セリン、T：トレオニン、Q：グルタミン、G：グリシン、H：ヒスチジン、A：アラニン、Y：チロシン、R：アルギニン、P：プロリン、M：メチオニン、V：バリン、W：トリプトファン、K：リジン、F：フェニルアラニン、I：イソロイシン、L：ロイシン。

表1

調製した30kDa蛋白のエドマン分解産物の収量（pmol単位）

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
D	2.7	3.2	3.1	2.7	4.9	3.3	3.2	3.4	3.4	4.0	2.2	2.4	3.3	2.1	2.1
E	5.4	4.5	4.9	3.4	3.9	4.3	33.0	6.0	4.7	3.4	4.2	4.6	3.7	22.1	5.4
N	5.1	4.4	4.0	2.6	1.8	3.5	2.9	2.9	2.5	3.4	2.5	2.4	3.3	2.5	4.5
S	5.1	24.6	7.3	20.6	6.3	3.1	3.2	3.8	2.9	2.8	23.3	5.4	2.9	3.7	4.1
T	3.8	3.4	3.6	2.3	2.5	2.4	2.5	2.6	2.4	3.3	3.5	2.4	2.5	2.3	2.3
Q	5.5	4.5	3.8	2.9	2.9	3.7	4.8	25.4	3.6	3.4	2.4	3.7	3.6	3.8	3.4
G	4.3	4.4	3.4	3.2	3.0	2.4	2.5	3.3	4.8	2.6	4.1	3.3	3.5	3.4	2.5
H	3.6	2.4	1.7	1.9	2.5	2.4	1.9	3.8	3.4	22.0	5.4	3.5	3.7	3.9	2.7
A	34.1	6.5	29.9	4.1	5.2	4.7	3.6	3.9	4.9	3.9	7.4	4.9	6.6	3.9	4.9
Y	7.5	5.3	5.0	5.2	41.1	29.5	6.4	4.0	23.7	5.7	3.9	3.4	2.3	2.5	2.6
R	3.4	3.8	2.4	3.1	2.9	3.5	2.3	3.4	3.2	3.0	3.5	3.2	3.3	3.4	3.4
P	3.9	3.2	3.2	3.5	2.4	2.8	3.1	3.3	3.6	3.9	2.4	2.9	2.3	2.6	2.5
M	2.4	2.0	1.3	1.0	1.4	1.6	1.4	1.4	1.1	2.3	2.0	2.6	1.9	2.3	2.1
V	3.2	3.0	3.1	3.7	3.0	3.5	3.6	3.8	4.1	4.3	2.4	3.9	4.0	3.1	3.6
W	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
K	3.6	2.4	3.9	3.8	3.8	3.3	3.0	3.5	2.9	2.5	2.0	2.1	1.9	2.5	2.9
F	2.9	1.4	1.4	1.5	1.8	1.9	1.9	1.5	2.0	1.5	2.3	3.0	2.2	2.7	3.1
I	3.5	3.3	3.6	4.2	3.5	2.9	3.4	3.4	3.1	3.1	4.5	3.4	4.4	4.8	24.1
L	2.5	2.4	2.5	3.7	3.5	4.1	3.6	2.4	2.2	2.3	2.6	22.3	4.4	3.6	2.7

その結果、30kDaタンパク質は成熟型ヒト血漿CPBのN末端配列と同一であることが明らかになった。30kDaタンパク質の実体を解明し、40kDaタンパク質と30kDaタンパク質との関連を明らかにするために、アミノ酸配列決定の結果を用いた海馬mRNAのRT-PCR解析およびヒト海馬cDNAライブラリーの免疫学的スク

リーニングという2つの方法によって、40kDaタンパク質をコードするcDNAの分子クローニングを行った。

まず、quickPrep™ mRNA精製キット（Amersham Pharmacia、UK）を用いて、2例の脳の凍結海馬ブロックからポリ(A)⁺RNA（poly(A)-rich RNA）を調製した。GublerとHoffmannの方法（Gubler, U. and Hoffman,B.J. (1983) Gene, 25, 263-269）に従ってヒト海馬cDNAライブラリーを作製した。第1ストランドのcDNAは、合成オリゴ(dT)をプライマーとしてクローン化Moloneyマウス白血病ウイルス逆転写酵素（FPLC-pure™、Amersham Pharmacia、UK）を用いて、ポリ(A)⁺RNA 1.5μgから合成した。続いて、クローン化大腸菌リボヌクレアーゼH（Amersham Pharmacia、UK）の存在下でクローン化大腸菌DNAポリメラーゼI（Takara、Japan）を用いて、第1ストランドのDNAから第2ストランドのcDNAを合成した。T4ファージポリメラーゼ（Takara、Japan）によって2本鎖cDNAを平滑末端化し、大腸菌EcoRIメチラーゼ（Takara、Japan）を用いてそのEcoRI部位を修飾した後に、EcoRIリンカーを連結した。DNAライゲーションキット（Takara、Japan）を用いてλgt11ファージベクターのEcoRIアームとcDNAとの連結を行い、続いてin vitroでパッケージングを行った（PhageMaker™、Takara、Japan）。宿主菌として大腸菌Y1090r⁻を用いた場合、このライブラリーの効率は9.0×10^5プラーク形成単位(pfu)／ポリ(A)⁺RNA 1μgであった。

次に、単離した40kDaタンパク質に対するポリクローナル抗体（1:1500に希釈）（後述）を用いて、上記のλgt11ヒト海馬ライブラリーの免疫学的スクリーニングを行った（StJohn, T.P. (1989) Screening with antibodies. In Ausubel, F.M. et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology., John Wiley and Sons, New York, USA, pp. 6.7.1-6.7-5）。3×10^5プラーク形成単位（pfu）のファージクローンのスクリーニングにより3つの陽性クローンが分離された。制限エンドヌクレアーゼによる消化プロフィールはいずれのDNAも極めて類似していたため、最も長い挿入断片を持つクローンの構造を解析した。塩

基配列決定はPRISMTM自動シークエンサー（Applied Biosystems、USA）を用いて行った。

この結果同定された1544bp長のcDNA（配列番号：1）には、360個のアミノ酸残基（配列番号：2）をコードすると予想される1083bp長の読み枠が1つ存在する（図3）。コンピュータを用いたホモロジー解析により、このcDNAはヒト血漿CPB（HPCPB）（Eaton, D.L. et al.(1991) J. Biol.Chem.,266,21833-21838）と高い相同性があることが示された。相同性を有する他のタンパク質としては、組織型CPB（Yamamoto, K.K. et al.(1992) J. Biol. Chem., 267, 2575-2581）および肥満細胞CPB（Goldstein, S.M. et al.(1989) J. Clin. Invest., 83, 1630-1636）が同定された。プレプロヒト血漿CPBと、同定されたヒト脳プロテアーゼ（プレプロヒト脳CPB）の構造の比較では、後者（プレプロヒト脳CPB）も、成熟型酵素（ヒト脳CPB）では246アミノ酸、ヒト血漿CPBでは317アミノ酸）の前にシグナルペプチド（22アミノ酸）および活性化ペプチド（92アミノ酸）が存在するという共通のCP構造を持つことが示された（図4A）。両者の差は成熟型酵素の配列にある。第1に、成熟型血漿酵素の中央部にある37個のアミノ酸残基は、プレプロヒト血漿CPBの198～334番目のアミノ酸残基（プレプロヒト血漿CPB cDNAの633～743番目のヌクレオチド残基）に対応するが、これはヒト脳CPBには存在しない。第2に、プレプロヒト血漿CPB cDNAの1190～1241番目の残基に対応するヌクレオチドが存在しないために40個のアミノ酸残基（プレプロヒト血漿CPBの384～423番目のアミノ酸残基）の欠失がもたらされ、フレームシフトによってプレプロヒト脳CPBのC末端に特有な14個のアミノ酸残基が生じる。前者の変化は最終的にはインフレーム欠失をもたらし、後者は別の欠失を引き起こし、そのためにプレプロヒト血漿CPB mRNAの3'非コード領域（4アミノ酸）および異なる停止コドンを含む異なるフレームの翻訳に起因するアミノ酸の変異が生じる。

ヒト脳CPBに特有なC末端14アミノ酸残基（C14）に相同なペプチド配列の有無をペプチドおよびタンパク質に関する最新のデータベースで検索した（図4B）。最も相同性の高かったペプチドは、種々の植物種の葉緑体ATP合成酵素γサブユニットのドメイン中に認められた（Inohara, N. et al.(1991) J.Biol.Chem., 266, 7333-7338）。C14ペプチドと葉緑体の光依存的調節ドメインのN末端領域に位置するこれらの植物ペプチドとの間の相同性は極めて高い（85%を上回った）。9個の同一アミノ酸に加えて、アミノ酸の4番目（プロリン）、5番目（バリン）および13番目（ロイシン）はそれぞれ機能的に同一な（中性かつ疎水性）アミノ酸であるバリン、トレオニンおよびプロリンによって置換されている。

次に、30kDaタンパク質をコードするcDNAを得るため、免疫学的スクリーニングとは独立に、RT-PCR法および3'RACE（rapid amplification of cDNA ends）系（GIBCO-BRL、USA）を用いて脳CPBのcDNAの単離を試みた。テンプレートとしては、上記ライブラリー作製に用いたものとは異なり、3例の正常脳から調製した海馬poly(A)$^+$RNAを用いた。cDNAはアミノ酸配列決定結果（表1）に基づいて合成したセンスオリゴヌクレオチド（5'-GCCTCCGCATCGTACTATGAACAGTATCAC-3'／配列番号：6）を用い、アンチセンスプライマーとしてオリゴ(dT)を有するアダプタープライマーを用いてSUPERSCRIPTTM逆転写酵素（GIBCO-BRL、USA）により合成した。その結果、RT-PCR産物として1077bpの単一のバンドのみが検出された（図4C、レーン1）。HPLCによる精製後にPCR産物のシークエンス解析を行った。塩基配列決定はPRISMTM自動シークエンサー（Applied Biosystems、USA）を用いて行った。

その結果、この配列は成熟型ヒト脳CPBに対応する、プレプロヒト脳CPB cDNAのヌクレオチド360～1436と同一であった。すなわち、2種のクローニング手順により得られたいずれのcDNAも、海馬内の同一のmRNAに由来することが示された。また、この結果から、30kDaのタンパク質は、40kDaのタンパク質と同一

の遺伝子にコードされており、40kDaタンパク質のN末部分が切り出されて、30kDaのヒト脳CPB成熟タンパク質が生成するものと考えられる。

[実施例３] 各種組織におけるノーザンブロット解析

種々の臓器からのRNA試料を用いて、プレプロヒト脳CPB mRNAまたはそのホモログの発現を解析した。まず、正常剖検標本から調製したヒトの脳（海馬）、心臓、膵臓、腎臓、肝臓および脾臓に由来するポリ(A)$^+$RNA 1μgを、MOPS（3-[N-モルホリノ]プロパンスルホン酸）緩衝液（20mM MOPS（pH7.0）、5mM NaOAcおよび1mM EDTA、6.6%ホルムアルデヒドを含む）中で1%アガロースゲルにて電気泳動した。電気泳動後にキャピラリーブロット法によってゲルからナイロン膜（Hybond N$^+$、Amersham Pharmacia、UK）に転写し、ベーキングによって固定した。続いてブロットをExpressHybTMハイブリダイゼーション溶液（Clontech、USA）中にて68℃で1時間ハイブリダイズさせた。

プローブは、5'-GGTTCATAGGCCATAATCGAATGT-3'（配列番号：７）をセンスプライマー（cDNAのヌクレオチド596～618に対応）、5'-TCAGGGGCATTAAACATTCCTAAT-3'（配列番号：８）をアンチセンスプライマー（cDNAのヌクレオチド1135～1112に対応）として用い、Takara TaqTM組み換えTaqポリメラーゼ（Takara、Japan）を用いたPCRによって増幅したプレプロヒト脳CPB cDNAのC末端部分538bpを用いた（図4C、レーン2）。ヒトβ-アクチンcDNAプローブ（Clontech、USA）を対照として用いた。以上のプローブには、ランダムプライマーDNAラベリングキット（Takara、Japan）を用いて[α-^{32}P]dCTPによる放射標識を行った。ブロットを2×SSC中、続いて2×SSC、0.1%SDS中にて室温で20分ずつ各2回洗浄し、さらに0.1×SSC、0.1%SDS中で65℃、40分間の洗浄を2回行った。

プレプロヒト脳CPB cDNAのDNA配列がプレプロヒト血漿CPB cDNAと非常に相同性が高いことから予想された通り（図4A）、ヒト肝臓ではこのプローブにより1.8kbバンドの大量発現が認められた（図5、レーン6）。これに対して、ヒト脳RNAでは1.5kbバンドの発現がはるかに低い強度で検出された（図5、レー

ン1）。心臓、胎盤、膵臓、腎臓および脾臓由来のRNA試料は、このプローブに反応するシグナルを発現しなかった（図5、レーン2、3、4、5および7）。脳および肝臓におけるmRNAシグナルのサイズの差は、プレプロヒト脳CPBおよびプレプロヒト血漿CPBのcDNAのコード領域のサイズの差とよく一致していた。また、この結果は、膵臓内で大量に発現される組織型CPをこのプローブが分離することを示している。

［実施例４］ 40kDaプロテアーゼおよびプロテアーゼのC末端14アミノ酸ペプチドに対するポリクローナル抗体の調製、ならびにウエスタンブロット解析

ベンズアミジン-セファロースカラムに結合した画分を調製用SDS-PAGEによって分離し、液相回収装置中に回収して、ニュージーランドホワイトウサギ2匹を免疫するのに十分な量（2mg）の40kDaプロテアーゼを調製した。40kDaのタンパク質が均質なものとして分離されたことは、SDS-PAGEプロフィールから明らかである（図6A）。未変性PAGEの場合とは異なり、最初の分離段階がSDS-PAGEの場合には、変性した40kDaタンパク質を均質化するためのイオン交換クロマトグラフィーによる分離をさらに行う必要はなかった。調製された40kDaのプロテアーゼタンパク質を抗原として用いて、ウサギに抗プレプロヒト脳CPBポリクローナル抗体を産生させた。抗血清を得、IgG画分をEZ Prep（Pharmacia）により精製した。抗原に対する特異性を抗体価で検討したところ、プレイミューン血清（対照抗体）と比較して2000倍の感度を有することが示された。これとは別に、このプロテアーゼに特有なC末端14アミノ酸残基に対応するオリゴペプチドNH_2-SNPPVEKLLPLSLK-COOH（配列番号：９）に対して、抗C14抗体を産生させた。このオリゴペプチドは、3-マレイミド安息香酸N-ヒドロキシサクシミドエステル（Sigma、USA）を用いて、キーホールリンペットヘモシアニン（Calbiochem、USA）と結合させてからウサギの免疫化に用いた。得られた抗血清を、オリゴペプチドを結合させたセファロースCL-4Bカラムにてアフィニティ精製した。

この特異性を抗体価で検討したところ、プレイミューン血清（対照抗体）と比較してオリゴペプチドに対して1500倍の感度を有することが示された。

未変性PAGEによって分離した画分をSDS-PAGE後、抗原として用いて、実施例1と同様のウエスタンブロット解析によって上記の抗体の特異性を検討した（図6B）。その結果、抗プレプロヒト脳CPBポリクローナル抗体は、単一の40kDaバンドを検出し、そのバンド強度はタンパク質分解活性が最初に認められた画分19（図1B）で最も高かった。種々の脳試料から得た海馬ホモジネートの解析では、この抗体によって40kDaおよび30kDaのバンドが検出された（図6C、レーン1～4）。この結果は、分子量40kDaおよび30kDaに対応する2つの未変性PAGE画分にAPP分解活性があり、30kDaタンパク質が成熟型プレプロヒト脳CPBであるとの所見と関連している。抗C14抗体を用いたウエスタンブロット解析では、脳試料に関しては本質的に同じ結果が得られたが（図6C、レーン5～7）、ヒト肝臓ホモジネート中には免疫反応性バンドは全く検出されなかった。これは、抗C14抗体がヒト脳内のヒト脳CPBを認識することを意味している。

正常人およびアルツハイマー病患者の髄液および抹消血清をサンプルとし、抗C14抗体を用いたウェスタン法により解析したところ、いずれのサンプルにも抗C14抗体の免疫反応性が検出された。また、抹消血清中では、加齢に伴い免疫反応性が増加する傾向が認められた。

[実施例５]　免疫組織化学分析

実施例４で作製した、ヒト脳CPB（HBCPB）を特異的に認識する抗体を用いて、以下の免疫組織化学分析を行った。剖検直後に、免疫組織化学試験に用いるための標本を10%ホルムアルデヒド中に1週間以上保存することによって固定して、5μm厚のパラフィン切片を作製した。免疫組織化学分析はアビジン-ビオチン複合体（ABC）法によって行った。脱パラフィン処理後、3%過酸化水素中に5分間浸漬することによって内因性ペルオキシダーゼの失活を行い、切片をクエン酸ナトリウム緩衝液中に浸し、続いてリン酸緩衝生理食塩水中に浸漬した。次いでこ

れを1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水で1：100に希釈した目的の一次抗体とともにモイストチェンバーにて4℃で一晩インキュベートした。反応産物を3,3'-ジアミノベンジジンによって可視化し、顕微鏡で観察した。対照標本では、一次抗体として免疫前血清を用いた。

5例の正常脳ではすべて、検討したニューロンの大半で抗プレプロヒト脳CPBおよび抗C14免疫反応性がいずれも細胞質（神経細胞体）内で検出された（図7）。海馬錐体ニューロン（図7A、B、CおよびD）および外側膝状体ニューロン（図7E、FおよびG）は特にこれらの抗体に関して均一に免疫反応性であった。舌下運動ニューロン、視床ニューロン、基底核などの他のニューロンにも免疫反応性が認められたが、海馬顆粒細胞はこれらの抗体では染色されなかった。神経細胞体に限局的なヒト脳CPBの発現は顆粒状かつユビキタスであり、抗C14免疫反応性も顆粒状に発現された（図7DおよびG）。抗ヒトCD68抗体を用いた染色によって同定された海馬実質中のミクログリアの一部は、抗ヒト脳CPBおよび抗C14免疫反応性をいずれも強く発現した。このようなミクログリアは細胞外基質内（図7B）、ニューロンと直接隣接した位置（図7C）または血管周囲（図7E）に位置する。抗グリア線維性酸性タンパク質（GFAP）抗体を用いた本発明者らの解析では、すべての正常脳に関して抗プレプロヒト脳CPBおよび抗C14免疫反応性を同時発現するGFAP陽性アストロサイトは認められなかった。ヒト脳CPBプロテアーゼを明瞭に発現した他の種類の細胞は、上衣細胞および脈絡叢細胞（図7HおよびI）であり、細胞質でのユビキタスな発現は顆粒状であった。

免疫蛍光共焦点レーザー顕微鏡検査により、ニューロンにおけるこのプロテアーゼの正確な細胞内局在を検討した（図8）。抗体としては、抗ヒトニューロフィラメント抗体（Sanbio、USA）、抗ヒトCD68モノクローナル抗体（R&D Systems、USA）、抗ヒトGFAPモノクローナル抗体（Advance Immunochemical、USA）、抗Aβ1/40抗体（US Peptides、USA）、抗プレプロヒト脳CPB抗体および C14抗体を用い、MRC-1024共焦点レーザー顕微鏡（Bio Rad、USA）で観察した。この

結果、海馬錐体ニューロン（図8A、B、C、G、HおよびI）、外側膝状体ニューロン（図8D、E、およびF）ともに、免疫反応性は明瞭に細胞質（神経細胞体）内に典型的な顆粒状様式で存在しており、抗ヒト脳CPB（図8A～F）および抗C14（図8G～I）抗体のいずれによっても検出された。Aβペプチドとこのプロテアーゼの局在との関係を解析するために抗ヒトAβ1/40および抗C14抗体を用いて海馬切片を解析した（図8J、KおよびL）。この2つの免疫反応性は錐体ニューロンの神経細胞体内に顆粒として共存していた。C14免疫反応性はグリア（ミクログリアと思われる）内でも認められたが、Aβ1/40免疫反応性は主に神経細胞体に認められた。

5例の孤発性アルツハイマー病患者から得た脳組織も解析した。アルツハイマー病患者のニューロン、特に海馬錐体ニューロンでは、ヒト脳CPBは正常試料のようにユビキタスではなく、錐体ニューロンの一部では免疫反応性が全く認められなかった（図9AおよびB）。検討したすべてのアルツハイマー病患者の脳で海馬実質中に抗C14免疫反応性の細胞外沈着が検出され、これにはグリア浸潤を伴う斑状沈着として認められるもの（図9B）と、細胞浸潤を伴わないより均一な沈着として認められるもの（図9C）があった。正常脳と比較して、アルツハイマー病患者の脳では抗プレプロヒト脳CPBおよび抗C14抗体に対する免疫反応性を有するミクログリアの数が増加しており、海馬実質中に免疫細胞がクラスターとして認められた（図9F）。ミクログリアを特異的に認識する抗CD68抗体またはC14抗体を用いて連続切片を解析したところ、免疫反応性細胞はミクログリアであり、この細胞ではいずれの抗体でも免疫反応性を示す呈色が共存していた（図9DおよびE）。検討したすべてのアルツハイマー病患者で海馬内に老人斑が存在しており、図9Bに示す通り、抗C14免疫反応性は老人斑の位置と共通していた。アミロイド体は検討したすべてのアルツハイマー病患者の脳組織中で検出されたが、抗C14抗体に関する免疫反応性はいずれも発現しなかった（図9

G）。アルツハイマー病患者の脳での上衣細胞および脈絡叢細胞の免疫反応性は正常脳と差が認められなかった。

［実施例６］ 既知のCPBファミリーとの比較検討

CPBの精製および特徴分析が最初になされて以来（Folk, J.E. and Gladner,J. A.（1958） J. Biol.Chem., 231, 379-393）、CPBが明らかに同定されているのは膵臓のみであった（Pascual, R. et al.(1989) Eur. J. Biochem., 179, 606-616; Yamamoto, K.K. et al.(1992) J. Biol. Chem., 267, 2575-2581）。このプロテアーゼは以前には消化器官のみから分泌される消化酵素と考えられていた。比較的最近になって、CPBとその相同酵素は、肥満細胞分泌顆粒などの消化器以外の組織（Goldstein, S.M. et al.(1989) J. Clin. Invest., 83, 1630-1636; Reynolds, D.S. et al.(1992) J. Clin. Invest., 89, 273-282）や血漿中（Eaton, D.L. et al.(1991) J. Biol.Chem.,266,21833-21838）にも見いだされた。詳細な特徴が明らかにされている膵臓内のCPに基づくと、この酵素群には特徴および特異性が異なる成熟型酵素を生成する２つのプレプロCP、すなわちA型（CPA）およびB型（CPB）が存在する（Blackburn, S.（1976） Carboxypeptidase A and carboxypeptidase B. In Blackburn, S.(ed.), Enzyme Structure and Function, Marcel Dekker, New York, pp.169-223）。トリプシンはシグナルペプチドおよび活性化ペプチドを除去することにより、CPAとCPBの両方を活性化する。ヒト肥満細胞分泌顆粒内のCPの生化学的特徴は組織型CPの特徴と類似しており、これらの33～40kDaのZn-メタロペプチダーゼは中性からやや塩基性のpHで活性であり、ジャガイモカルボキシペプチダーゼ阻害因子、EDTA、フェナントロリンおよび8-ヒドロキシキノリンによって阻害され、免疫刺激を受けると肥満細胞から放出される（Goldstein, S.M. et al.(1989) J. Clin. Invest., 83, 1630-1636）。

プレプロヒト脳CPB cDNAの構造解析では、ヒト脳CPBはHPCPBとの相同性が高く（70％を上回る）、ヒト肥満細胞ヒト膵臓CPBとの相同性は中等度（ほぼ2

5%）であった。ヒト血漿および肥満細胞のCPBと同じく、ヒト脳CPBには活性化ドメインにアスパラギン結合オリゴサッカライドを生成するグリコシル化部位と推定される3つの部位が保存されている（図3）。これらのCPBの間では、基質結合に関与するアミノ酸残基（Arg-183、Asn-204、Arg-205、Arg-220、Ser-274、Tyr-275、Tyr-326およびAsp-333）および亜鉛との結合に関与するアミノ酸残基（His-181、Glu-184およびHis-273）は高度に保存されている。これらの2つのcDNAに対応するゲノムDNA構造はまだ決定されていないが、cDNA構造の比較から、HPCPB遺伝子はヒト脳CPB遺伝子の先祖遺伝子であることが示唆される。ヒト膵臓プレプロCPBをコードする相同遺伝子の存在という観点から考えると（Reynolds, D.S. et al.(1992) J. Clin. Invest., 89, 273-282）、プレプロヒト脳CPB cDNAのエキソン-イントロン境界を推定することができる。脳プロテアーゼ（ヒト脳CPB）では発現されない37個のアミノ酸に対応するDNAはヒト膵臓遺伝子のエキソン7に対応する1つのエキソンによってコードされており、これは選択的スプライシング機構の結果である可能性が高い。プレプロHPCPBのC末端部分に位置し、ヒト脳CPB中には存在しない18個のアミノ酸は、1つのエキソンのみによってコードされるわけではない。プレプロHPCPB mRNAのヌクレオチド1190～1241に対応する52bpの欠失によってHPCPBからの18個のアミノ酸（385～401アミノ酸残基）の除去およびヒト脳CPBのフレームシフトが起こり、ヒト脳CPBに特有のC末端14アミノ酸残基を生じた。以上の所見は、プレプロヒト脳CPB mRNAが、選択的RNAスプライシングに由来する組織特異的アイソフォームではなく、プレプロHPCPBと同じ祖先遺伝子から最近になって進化した別の分子であることを示唆する。

成熟型CPは一般に塩基性が強く、中性pHでの実効電荷は全体で+10～20［(Lys+Arg)－(Asp+Glu)］である。構造解析ではヒト脳CPBは弱塩基性であり、実効電荷は+7であることが示されたが、肝臓内で合成されるヒト脳CPBや肥満細胞CPBはいずれも強塩基性であり、実効電荷は+11～16である。これらの構造的

特徴は、ヒト脳CPBも塩基性CPBファミリーのメンバーであり、このためC末端のアルギニンおよびリジン残基に対する特異性を有することを示唆する。

HPCPBの場合、予想される機能は血液凝固時の抗線溶作用であり、部分分解を受けたフィブリン上のプラスミノーゲン結合部位がこれによって除去されるために血漿凝血塊の溶解は遅延する（Sakharov, D.V. et al.(1997) J. Biol. Chem., 272, 14477-14482）。さらに、脳、血漿および膵臓のCPBのC末端部分の構造の比較から、基質結合部位である最もC末端の残基（プレプロHPCPBの第385残基のグルタミン）を含む18個のアミノ酸残基がヒト脳CPBには存在しないことが示された。ヒト脳CPBに特有のC末端14アミノ酸は、同定された他のCPのいずれの部分とも相同性が認められなかった（図4B）。この配列と最も高い相同性が認められたペプチドは、種々の植物種に由来する植物葉緑体ATP合成酵素γサブユニットの光依存性調節ドメインと隣接したN末端部に位置していた（図4B）。ATP合成酵素は電子伝達鎖によって生じたプロトンの電気化学的勾配との共役により、ATPを合成する。このγサブユニットは葉緑体ゲノムではなく核にコードされており、ATP合成酵素の光依存的調節に必須であると考えられている（Inohara, N. et al.(1991) J.Biol.Chem., 266, 7333-7338）。ヒト脳CPBでC末端14アミノ酸ペプチドが特有に発現されることの意義はまだ明らかではないが、ATP合成酵素の重要なドメインと相同性があることから、ATP依存性プロテアーゼおよびATPと結合してアセンブルする種々のタンパク質を含んでいる26Sプロテアソームとの関連性が示唆される。

膵臓CPは単量体として存在するだけでなく、タンパク質分解特性の異なる1つまたは2つのプロテアーゼとの二重または三重複合体としても存在する（Kerfeleck, B. et al.(1985) Eur. J. Biochem., 151,515-519）。例えば、ヒト膵臓プロCPAは分泌顆粒内ではプロプロテイナーゼEとの二重複合体である（Pascual, R. et al.(1989) Eur. J. Biochem., 179, 606-616）。ウシ膵臓内のプロテアーゼはキモトリプシノーゲンC／プロプロテイナーゼEとの三重複合体であ

り（Kobayashi, R. et al.(1981) J. Biol. Chem., 256, 2460-2465）、クジラ膵臓ではキモトリプシノーゲンCとの二重複合体である（Yoneda, T.（1980） Comp. Biochem. Physiol. 67B, 81-86）。この種のプロテアーゼが相補的なタンパク質分解特性を有する複合体を形成することには、消化作用を効率化する機能があると思われる。ヒト脳CPBの調製を通じて、プロプロテイナーゼEとキモトリプシノーゲンCはいずれも分子量やイオン交換クロマトグラフィーにおける親和度の点でヒト脳CPBとは異なったことから、ヒト脳CPBのエンドプロテアーゼ活性はヒト脳CPBとのプロテイナーゼ活性複合体によるものではない可能性が高い。タンパク質分解活性を持つ最終産物は、高感度銀染色によって可視化された単一の40kDaバンドであった。さらに、ヒト脳CPBの調製工程でヒトプロテイナーゼEの自己溶解を誘発するSDS（Sziegoleit, A. et al.(1985) Eur. J. Biochem., 151, 595-599）を用いておらず、このプロテイナーゼがヒト脳CPBとともに同時精製されたならば検出されたはずである。

天然型APPとコンドロイチナーゼで前処理したAPPを用いた場合のタンパク質分解効率の差は、荷電効果がタンパク質分解に影響することを示唆する。中等度に陽性荷電したヒト脳CPBは、陰性荷電したコンドロイチン硫酸部分を含む天然型APPを、それを含まないAPPよりもはるかに効率的に捕捉すると考えられる。ヒト脳内でこれが成り立つとすれば、APPファミリーに属する種々の分子が存在する。脳APPの一部には、特有のプロテオグリカンの成分であるアピカンが含まれる（Shioi, J. et al.(1992) J. Biol. Chem., 267, 13819-13822）。このコアタンパク質はエキソン15によってコードされる18個のアミノ酸を欠失したAPP695であり、これにはグルコサミノグリカン結合のための認識シグナル（エキソン14とエキソン16との間のアミノ酸残基に生じる）と結合したコンドロイチン硫酸複合糖質が含まれる（Pangalosら、1995 J. Biol. Chem., 270,10388-10391）。抗cAPP抗体を用いた天然型脳APPの免疫沈降の段階で、APPとの相同配列を持つAPLP1およびAPLP2が共沈すると考えられる。実際、コンドロイチン

硫酸はAPPとの場合と同じようにAPLP2の特定のアイソフォームと結合する（Thinakaran, G. et al.(1995) J. Biol. Chem., 270, 16522-16525）。しかし、抗Aβ1/14抗体を解析に用いた場合には、Aβの細胞外ドメインと相同な配列がこれらのタンパク質に存在しないことから、APLP1およびAPLP2に由来する断片は検出されなかった（Wasco, W. et al.(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10758-10762; Sprecher, C.A. et al.(1993) Biochemistry, 32, 4481-4486）。このため、APPおよび／またはアピカンや、現時点ではまだ同定されていないアイソフォームなどのAPPアイソフォームを伴うプロテオグリカンに由来するAβ含有ペプチドは、ヒト脳CPBの標的となりうる。脳APPの分子的多様性も、基質-プロテアーゼ間の厳密な関係に関連しており、それによってアルツハイマー病の病態生理の組織および種特異性が生じていると考えられる。

[実施例７] カルボキシペプチダーゼとしての蛋白分解作用

合成Aβ1-40およびAβ1-42（各0.1pM）を基質としてヒト脳カルボキシペプチダーゼB（0.01pMから0.2pMまで）を37℃で16時間作用させると、用量依存的に低分子ペプチドを形成した。ウェスタンブロット解析において、Aβ1-40基質については抗Aβ-N端抗体で低分子化ペプチド（数アミノ酸分がシフト）が確認できるが、これは抗Aβ40断片抗体では確認できない。一方、Aβ1-42基質についても抗Aβ-N端抗体で低分子化ペプチド（数アミノ酸分がシフト）が確認できるが、これは抗Aβ42断片抗体では確認できない。これらの実験的事実はヒト脳型カルボキシペプチダーゼBがニューロン内のAβペプチドのC端側アミノ酸を分解する可能性、特に凝集性の高いAβ1-42を代謝してより毒性の低いAβペプチドに変換する生理機能をもつ可能性を示唆する。

[実施例８] 神経外胚葉由来細胞におけるヒト脳CPBの発現

ヒトおよびラット由来の膵臓および精巣の組織切片についてヒト脳CPBに対する抗体（C端側14アミノ酸に対する抗体：抗C14モジュール抗体）を用いた免

疫組織化学的解析により、いずれの種もランゲルハンス島β細胞（インスリン産生細胞）の細胞質、および精巣間質ライデイッヒ細胞細胞質（図１０）に著明な免疫染色性を認めた。

この結果から、ヒト脳CPBが、インスリンと同じくβ細胞で産生されβアミロイドと類似した特性をもつアミリンを代謝する機能を有することが示唆される。アミリンのインスリン作用における機能を考慮すれば、ヒト脳CPBが特定の糖尿病の病態生理に関連する可能性がある。

また、ヒト脳CPBは、ヒト精巣ライディッヒ細胞の細胞質における発現も認められた。この事からヒト脳CPBがこの内分泌細胞で産生される多くの蛋白性ホルモンの産生・分泌・分解等に関与している可能性がある。

産業上の利用の可能性

本発明の脳CPBタンパク質は、脳APPを切断し、Aβ含有ペプチドを生成する生理的活性を有している。また、AβペプチドをC末端から分解する生理的活性をも有している。従って、脳CPBタンパク質は、病的なAPP代謝やAβ含有ペプチド生成を制御する治療薬となりうる他、Aβペプチドの生成やそれに関連する疾患（例えば、アルツハイマー病）の発症の分子メカニズムを解明するための有用なツールとなる。さらに、髄液や抹消血中にも微量発現する脳CPBは、APP・Aβ代謝異常を検査・診断するためのCNSの病態マーカーとしても有用である。脳CPBは、また、脳においてAβの蓄積を生じる疾患の医薬品候補化合物のスクリーニングに利用することも可能である。即ち、本発明により、脳においてAβの蓄積を生じる疾患の予防、治療や検査のための新規かつ有用な方法が提供された。

請求の範囲

１．　配列番号：２から４のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

２．　脳 APP に対するペプチダーゼ活性を有するタンパク質であって、下記（ａ）または（ｂ）より選択されるタンパク質。

（ａ）配列番号：２から４のいずれかに記載のアミノ酸配列において１若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質。

（ｂ）配列番号：１に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質。

３．　請求項１または２に記載のタンパク質をコードする DNA。

４．　配列番号：１に記載の塩基配列のコード領域を含む、請求項３に記載の DNA。

５．　請求項３または４に記載の DNA が挿入されたベクター。

６．　請求項５に記載のベクターを保持する宿主細胞。

７．　請求項６に記載の宿主細胞を培養し、該細胞内で発現した組み換えタンパク質を該細胞またはその培養上清から回収する工程を含む、請求項１または２に記載のタンパク質の製造方法。

８．　請求項１または２に記載のタンパク質に対する抗体。

９．　請求項１または２に記載のタンパク質の部分ペプチド。

１０．　配列番号：１に記載の塩基配列からなる DNA またはその相補鎖とハイブリダイズし、少なくとも１５塩基の鎖長を有するポリヌクレオチド。

１１．　請求項１または２に記載のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

（ａ）該タンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

（ｂ）該タンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

（ｃ）該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

１２．　請求項１または２に記載のタンパク質に結合する化合物。

１３．　請求項１１に記載の方法により単離されうる、請求項１２に記載の化合物。

１４．　請求項１または２に記載のタンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法であって、

（ａ）被検試料の存在下で、請求項１または２に記載のタンパク質にその基質を接触させる工程、

（ｂ）該基質の切断を検出する工程、および

（ｃ）被検試料非存在下において検出した場合（対照）比較して、請求項１または２に記載のタンパク質により引き起こされる該基質の切断を増加または減少させる活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

１５．　基質が脳 APP である、請求項１４に記載の方法。

１６．　請求項１または２に記載のタンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する活性を有する化合物。

１７．　請求項１４または１５に記載の方法により単離されうる、請求項１６に記載の化合物。

１８．　請求項１または２に記載のタンパク質を有効成分とする、Aβの生成調節剤。

１９．　請求項１または２に記載のタンパク質を有効成分とする、脳におけるAβの蓄積を生じる疾患の治療薬。

２０．　脳におけるAβの蓄積を生じる疾患が、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される、請求項１９に記載の治療薬。

２１．　請求項１２、１３、１６または１７に記載の化合物を有効成分とする、Aβ生成調節剤。

２２．　請求項１２、１３、１６または１７に記載の化合物を有効成分とする、脳におけるAβの蓄積を生じる疾患の治療薬。

２３．　脳におけるAβの蓄積を生じる疾患が老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される、請求項２２に記載の治療薬。

２４．　請求項１または２に記載のタンパク質を含有することを特徴とする、該タンパク質のペプチダーゼ活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング用キット。

２５．　請求項１または２に記載のタンパク質の基質をさらに含む、請求項２４に記載のキット。

２６．　基質が脳APPである、請求項２５に記載の方法。

２７．　脳におけるAβの蓄積を生じる疾患の検査方法であって、

（ａ）被検者から試料を調製する工程、

（ｂ）該試料に含まれる請求項１または２に記載のタンパク質の量を請求項８に記載の抗体を用いて検出する工程、を含む方法。

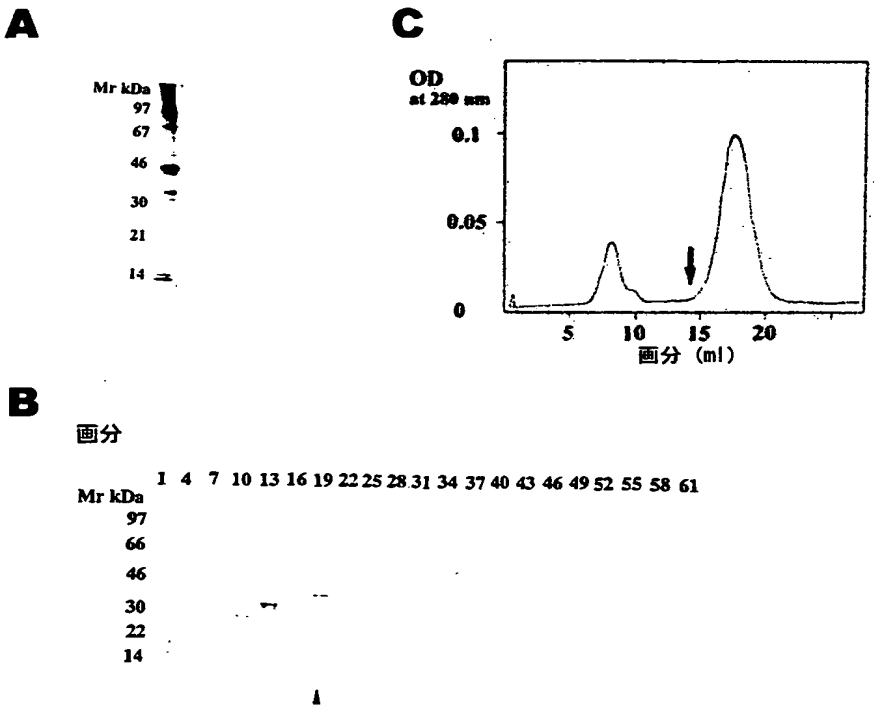
２８．　試料が髄液または血清である、請求項２７に記載の方法。

２９．　脳におけるAβの蓄積を生じる疾患が、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される疾患である、請求項２７または２８に記載の方法。

３０．　請求項８に記載の抗体を含む、脳におけるAβの蓄積を生じる疾患の検査薬。

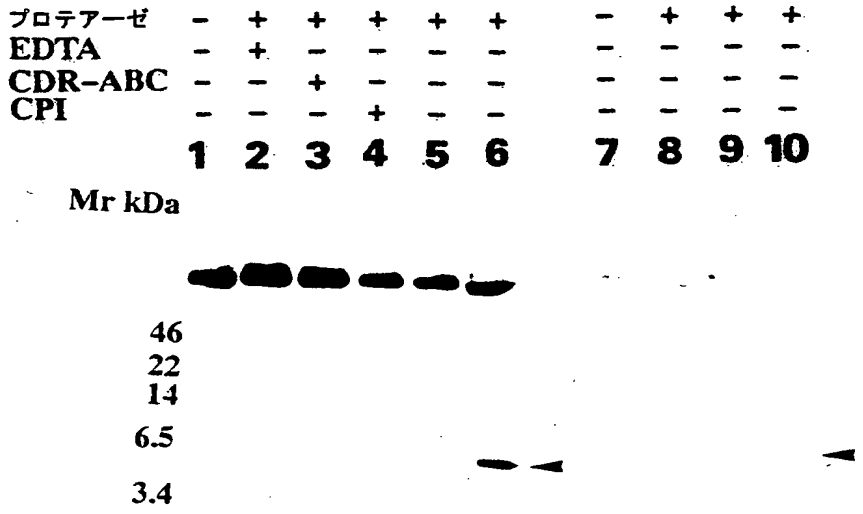
３１．　Aβの蓄積を生じる疾患が、老人性痴呆、アルツハイマー病、ダウン症、遺伝性脳出血、頭部打撲からなる群より選択される疾患である、請求項３０に記載の検査薬。

図1


A
Mr kDa
97
67
46
30
21
14
C
OD
at 280 nm
0.1
0.05
0
5
10
15
20
画分（ml）
B
画分
1 4 7 10 13 16 19 22 25 28 31 34 37 40 43 46 49 52 55 58 61
Mr kDa
97
66
46
30
22
14

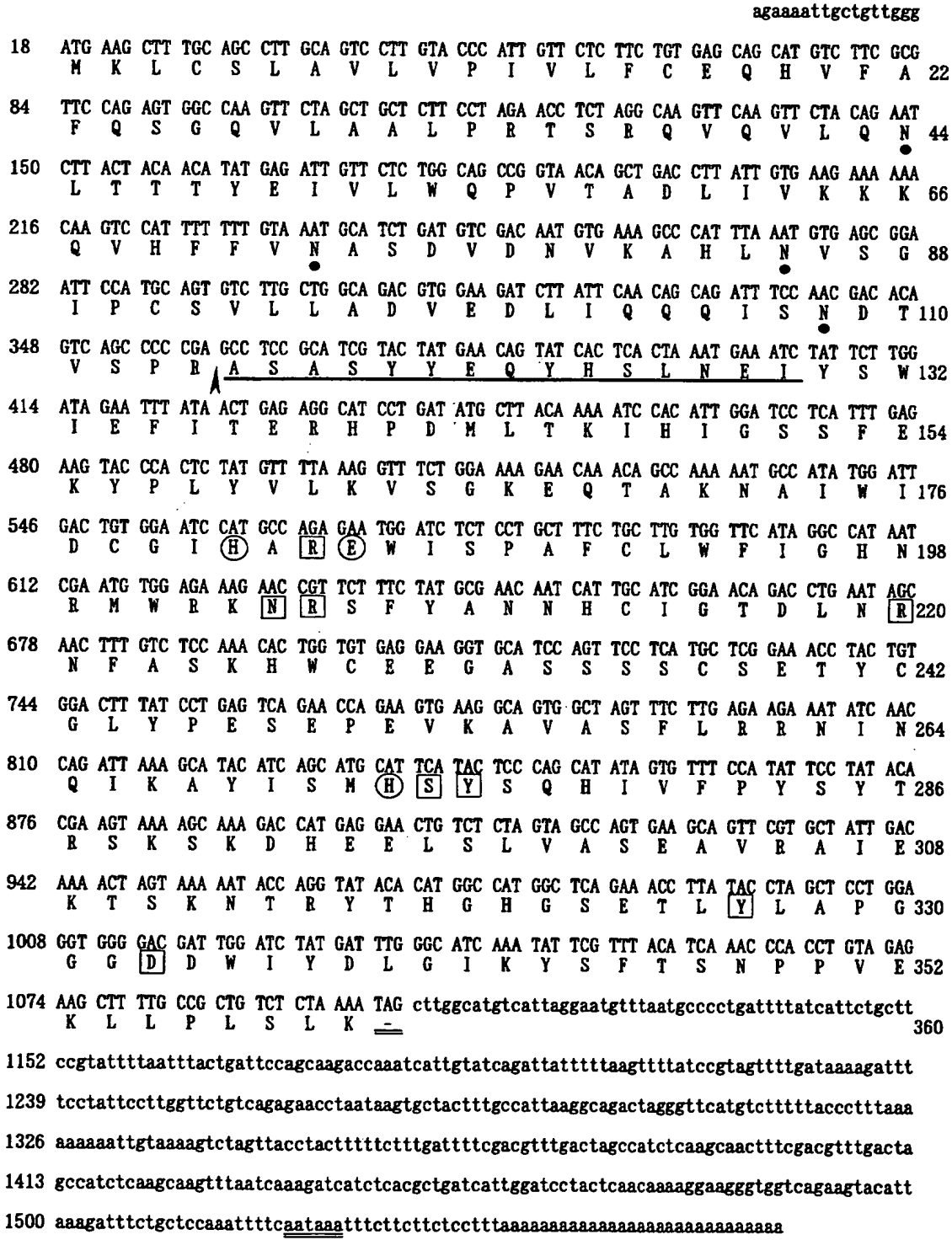
This Page Blank (uspto)

図2



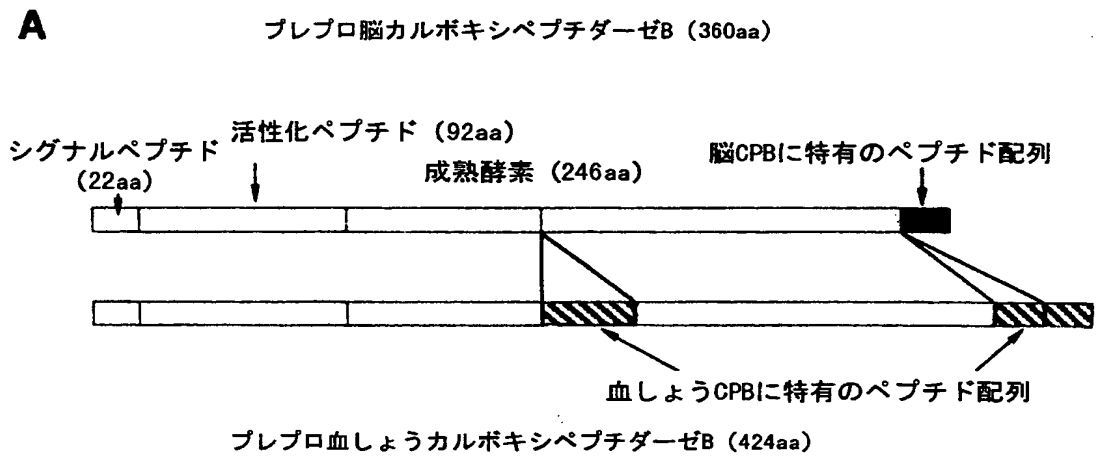
This Page Blank (uspto)

図3


agaaaattgctgttggg
18 ATG AAG CTT TGC AGC CTT GCA GTC CTT GTA CCC ATT GTT CTC TTC TGT GAG CAG CAT GTC TTC GCG
M K L C S L A V L V P I V L F C E Q H V F A 22
84 TTC CAG AGT GGC CAA GTT CTA GCT GCT CTT CCT AGA ACC TCT AGG CAA GTT CAA GTT CTA CAG AAT
F Q S G Q V L A A L P R T S R Q V Q V L Q N 44
150 CTT ACT ACA ACA TAT GAG ATT GTT CTC TGG CAG CCG GTA ACA GCT GAC CTT ATT GTG AAG AAA AAA
L T T T Y E I V L W Q P V T A D L I V K K K 66
216 CAA GTC CAT TTT TTT GTA AAT GCA TCT GAT GTC GAC AAT GTG AAA GCC CAT TTA AAT GTG AGC GGA
Q V H F F V N A S D V D N V K A H L N V S G 88
282 ATT CCA TGC AGT GTC TTG CTG GCA GAC GTG GAA GAT CTT ATT CAA CAG CAG ATT TCC AAC GAC ACA
I P C S V L L A D V E D L I Q Q Q I S N D T 110
348 GTC AGC CCC CGA GCC TCC GCA TCG TAC TAT GAA CAG TAT CAC TCA CTA AAT GAA ATC TAT TCT TGG
V S P R A S A S Y Y E Q Y H S L N E I Y S W 132
414 ATA GAA TTT ATA ACT GAG AGG CAT CCT GAT ATG CTT ACA AAA ATC CAC ATT GGA TCC TCA TTT GAG
I E F I T E R H P D M L T K I H I G S S F E 154
480 AAG TAC CCA CTC TAT GTT TTA AAG GTT TCT GGA AAA GAA CAA ACA GCC AAA AAT GCC ATA TGG ATT
K Y P L Y V L K V S G K E Q T A K N A I W I 176
546 GAC TGT GGA ATC CAT GCC AGA GAA TGG ATC TCT CCT GCT TTC TGC TTG TGG TTC ATA GGC CAT AAT
D C G I H A R E W I S P A F C L W F I G H N 198
612 CGA ATG TGG AGA AAG AAC CGT TCT TTC TAT GCG AAC AAT CAT TGC ATC GGA ACA GAC CTG AAT AGC
R M W R K N R S F Y A N N H C I G T D L N R 220
678 AAC TTT GTC TCC AAA CAC TGG TGT GAG GAA GGT GCA TCC AGT TCC TCA TGC TCG GAA ACC TAC TGT
N F A S K H W C E E G A S S S S C S E T Y C 242
744 GGA CTT TAT CCT GAG TCA GAA CCA GAA GTG AAG GCA GTG GCT AGT TTC TTG AGA AGA AAT ATC AAC
G L Y P E S E P E V K A V A S F L R R N I N 264
810 CAG ATT AAA GCA TAC ATC AGC ATG CAT TCA TAC TCC CAG CAT ATA GTG TTT CCA TAT TCC TAT ACA
Q I K A Y I S M H S Y S Q H I V F P Y S Y T 286
876 CGA AGT AAA AGC AAA GAC CAT GAG GAA CTG TCT CTA GTA GCC AGT GAA GCA GTT CGT GCT ATT GAC
R S K S K D H E E L S L V A S E A V R A I E 308
942 AAA ACT AGT AAA AAT ACC AGG TAT ACA CAT GGC CAT GGC TCA GAA ACC TTA TAC CTA GCT CCT GGA
K T S K N T R Y T H G H G S E T L Y L A P G 330
1008 GGT GGG GAC GAT TGG ATC TAT GAT TTG GGC ATC AAA TAT TCG TTT ACA TCA AAC CCA CCT GTA GAG
G G D D W I Y D L G I K Y S F T S N P P V E 352
1074 AAG CTT TTG CCG CTG TCT CTA AAA TAG cttggcatgtcattaggaatgtttaatgcccctgattttatcattctgctt
K L L P L S L K -
360
1152 ccgtattttaatttactgattccagcaagaccaaatcattgtatcagattatttttaagtttatccgtagttttgataaaagattt
1239 tcctattccttggttctgtcagagaacctaataagtgctactttgccattaaggcagactagggttcatgtctttttaccctttaaa
1326 aaaaaattgtaaaagtctagttacctacttttttctttgattttcgacgtttgactagccatctcaagcaactttcgacgtttgacta
1413 gccatctcaagcaagtttaatcaaagatcatctcacgctgatcattggatcctactcaacaaaaggaagggtggtcagaagtacatt
1500 aaagatttctgctccaaattttcaataaatttcttcttctcctttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

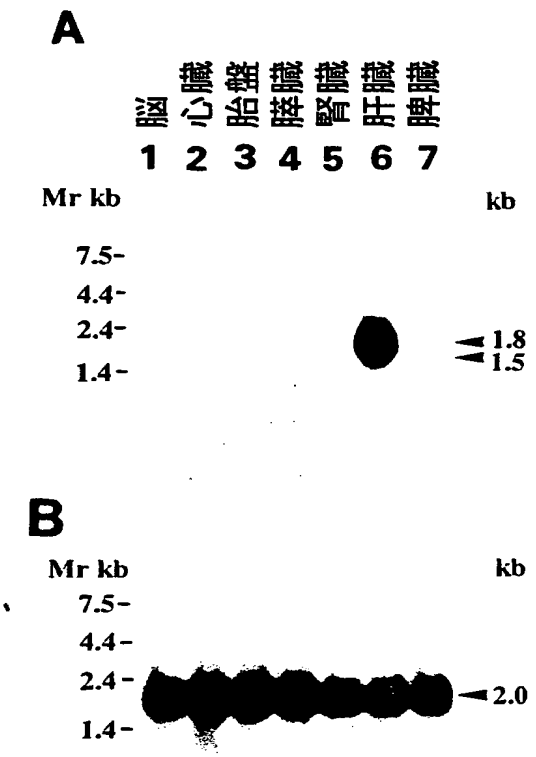
This Page Blank (uspto)

図４


A
プレプロ脳カルボキシペプチダーゼB（360aa）
シグナルペプチド
(22aa)
活性化ペプチド（92aa）
成熟酵素（246aa）
脳CPBに特有のペプチド配列
血しょうCPBに特有のペプチド配列
プレプロ血しょうカルボキシペプチダーゼB（424aa）
B
HBCPB2(347-360) S N P P V E K L L P L S L K C末端
atpSr(181-194) S N P T I G T L L P L S P M
atpSo(182-195) S D P V I H T L L P L S P K
atpC1(182-195) S E P V I H T L L P L S P K
atpC2(183-196) S D P V I H T L L P L S P K
C
1
Mr bp
2
1500
1000
500
100

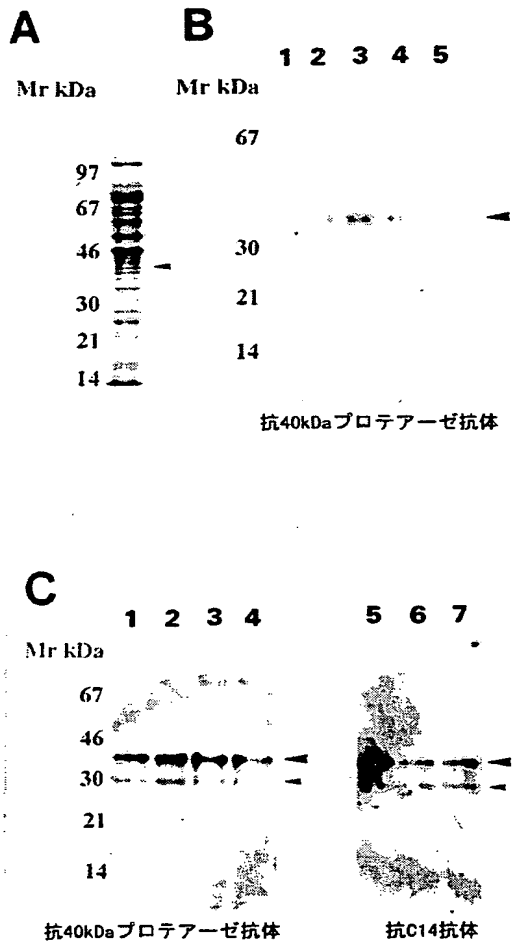
This Page Blank (uspto)

図5



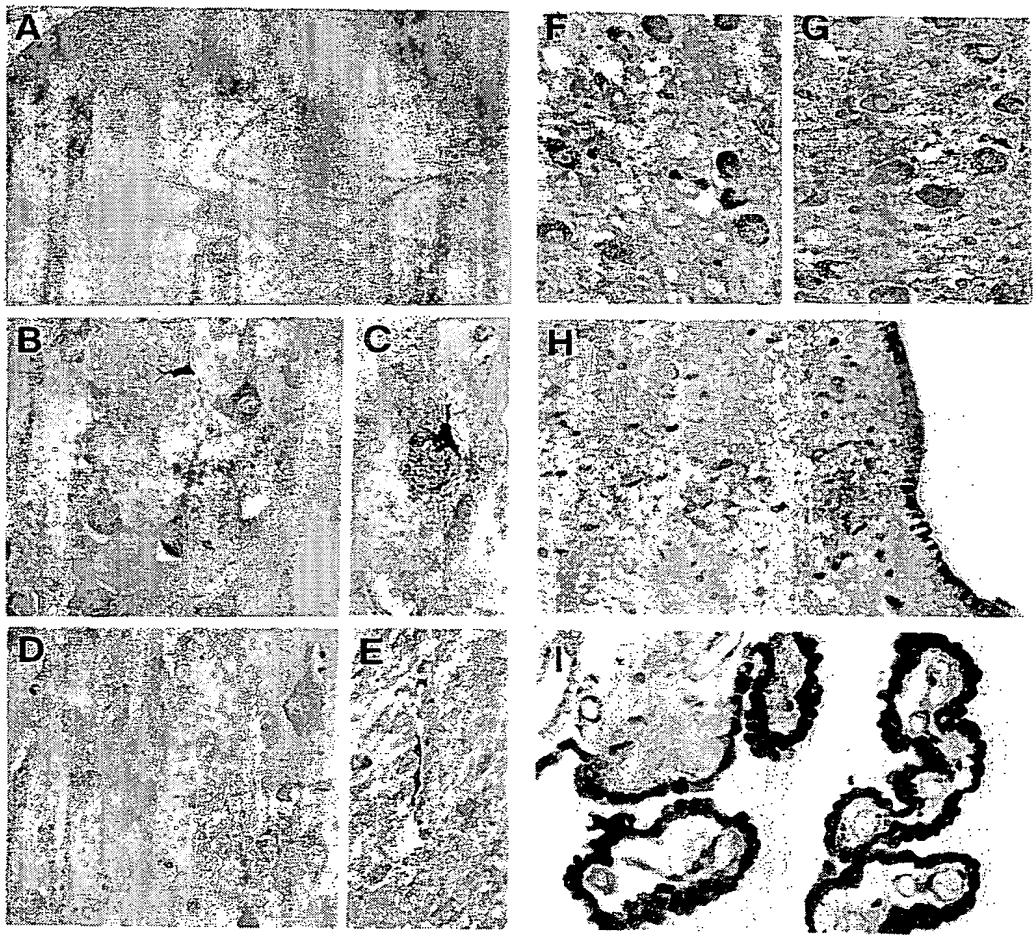
This Page Blank (uspto)

図6


A
Mr kDa
97
67
46
30
21
14
B
1 2 3 4 5
Mr kDa
67
30
21
14
抗40kDaプロテアーゼ抗体
C
1 2 3 4
5 6 7
Mr kDa
67
46
30
21
14
抗40kDaプロテアーゼ抗体
抗C14抗体

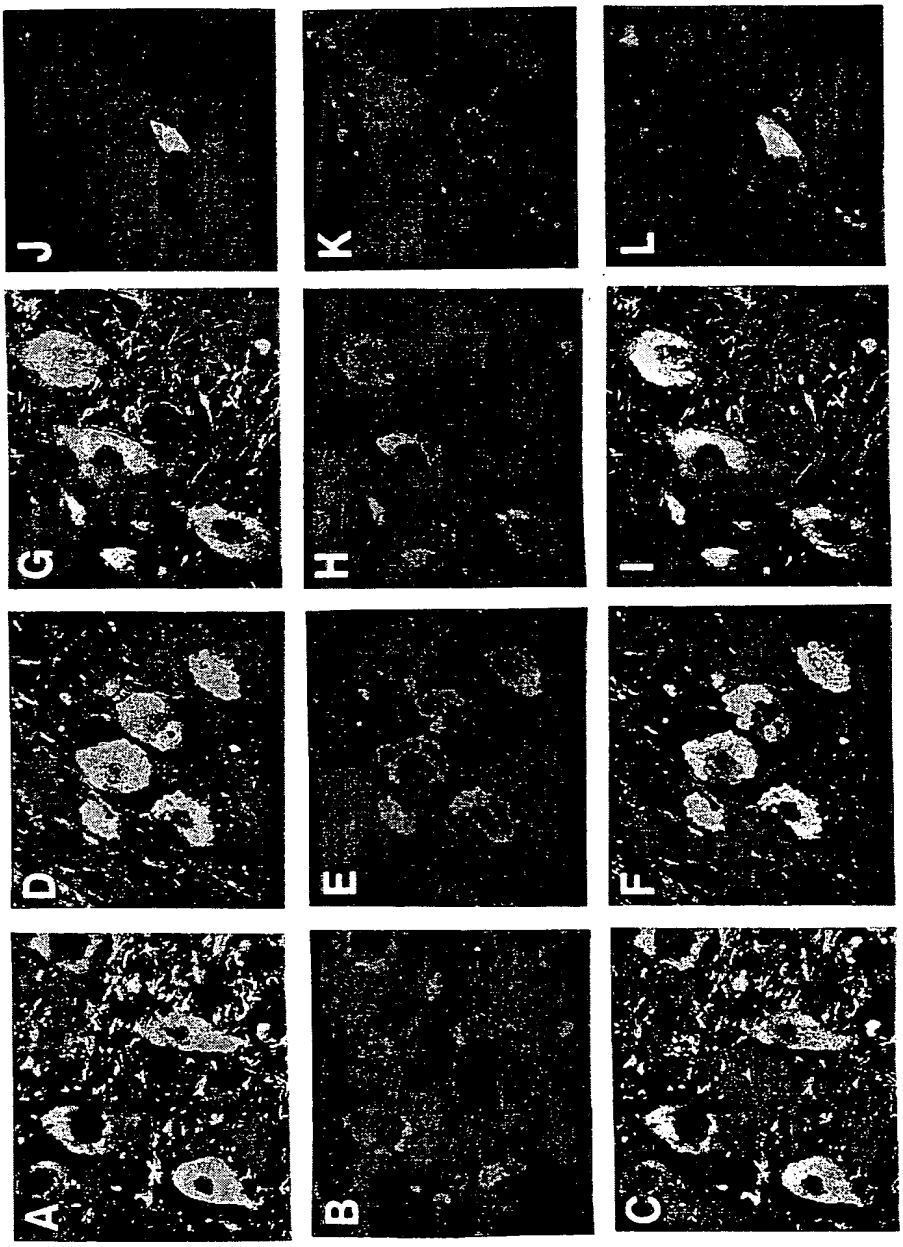
This Page Blank (uspto)

図7



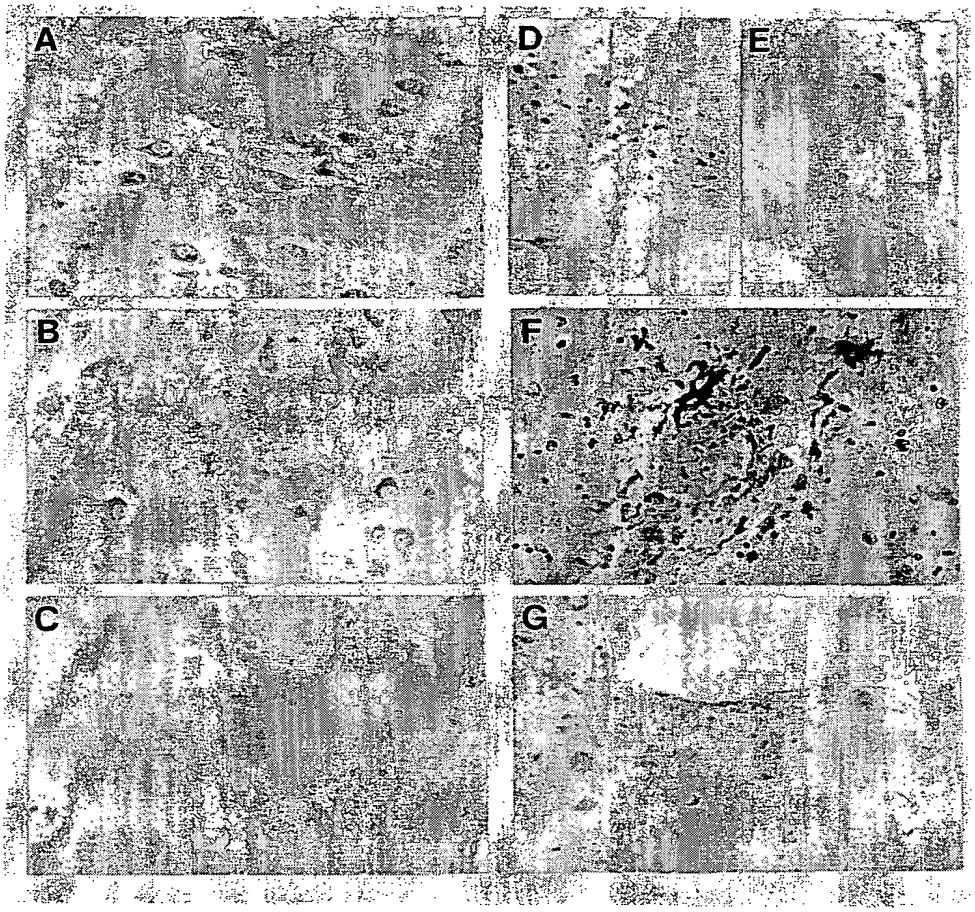
This Page Blank (uspto)

図8



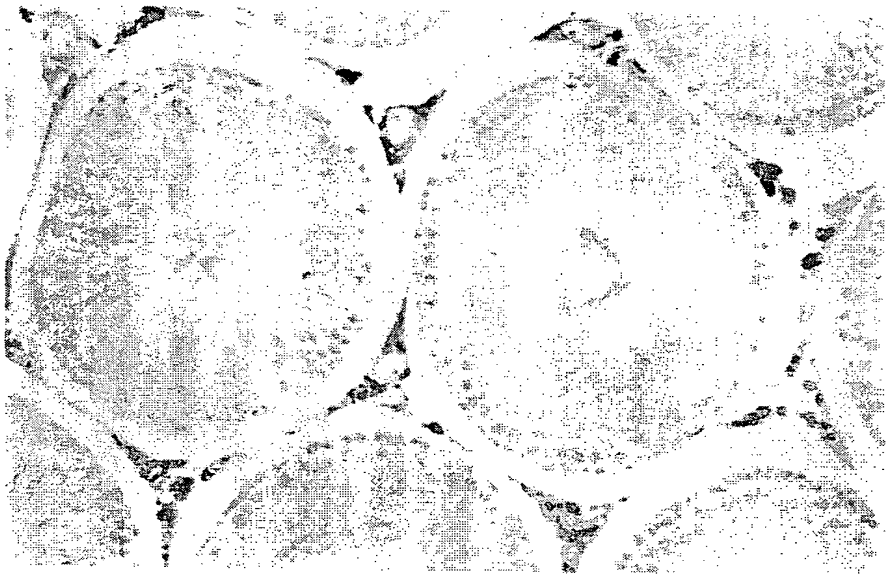
This Page Blank (uspto)

図9



This Page Blank (uspto)

図10





This Page Blank (uspto)

SEQUENCE LISTING

<110> AKIRA MATSUMOTO

<120> Human Brain Carboxypeptidase B

<130> MAT-101PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-125169

<151> 1999-04-30

<160> 9

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1573

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (18)..(1097)

This Page Blank (uspto)

<400> 1

agaaaattgc tgttggg atg aag ctt tgc agc ctt gca gtc ctt gta ccc 50
Met Lys Leu Cys Ser Leu Ala Val Leu Val Pro
1 5 10

att gtt ctc ttc tgt gag cag cat gtc ttc gcg ttc cag agt ggc caa 98
Ile Val Leu Phe Cys Glu Gln His Val Phe Ala Phe Gln Ser Gly Gln
15 20 25

gtt cta gct gct ctt cct aga acc tct agg caa gtt caa gtt cta cag 146
Val Leu Ala Ala Leu Pro Arg Thr Ser Arg Gln Val Gln Val Leu Gln
30 35 40

aat ctt act aca aca tat gag att gtt ctc tgg cag ccg gta aca gct 194
Asn Leu Thr Thr Thr Tyr Glu Ile Val Leu Trp Gln Pro Val Thr Ala
45 50 55

gac ctt att gtg aag aaa aaa caa gtc cat ttt ttt gta aat gca tct 242
Asp Leu Ile Val Lys Lys Lys Gln Val His Phe Phe Val Asn Ala Ser
60 65 70 75

gat gtc gac aat gtg aaa gcc cat tta aat gtg agc gga att cca tgc 290
Asp Val Asp Asn Val Lys Ala His Leu Asn Val Ser Gly Ile Pro Cys
80 85 90

This Page Blank (uspto)

agt gtc ttg ctg gca gac gtg gaa gat ctt att caa cag cag att tcc 338
Ser Val Leu Leu Ala Asp Val Glu Asp Leu Ile Gln Gln Gln Ile Ser
95 100 105

aac gac aca gtc agc ccc cga gcc tcc gca tcg tac tat gaa cag tat 386
Asn Asp Thr Val Ser Pro Arg Ala Ser Ala Ser Tyr Tyr Glu Gln Tyr
110 115 120

cac tca cta aat gaa atc tat tct tgg ata gaa ttt ata act gag agg 434
His Ser Leu Asn Glu Ile Tyr Ser Trp Ile Glu Phe Ile Thr Glu Arg
125 130 135

cat cct gat atg ctt aca aaa atc cac att gga tcc tca ttt gag aag 482
His Pro Asp Met Leu Thr Lys Ile His Ile Gly Ser Ser Phe Glu Lys
140 145 150 155

tac cca ctc tat gtt tta aag gtt tct gga aaa gaa caa aca gcc aaa 530
Tyr Pro Leu Tyr Val Leu Lys Val Ser Gly Lys Glu Gln Thr Ala Lys
160 165 170

aat gcc ata tgg att gac tgt gga atc cat gcc aga gaa tgg atc tct 578
Asn Ala Ile Trp Ile Asp Cys Gly Ile His Ala Arg Glu Trp Ile Ser
175 180 185

cct gct ttc tgc ttg tgg ttc ata ggc cat aat cga atg tgg aga aag 626
Pro Ala Phe Cys Leu Trp Phe Ile Gly His Asn Arg Met Trp Arg Lys

This Page Blank (uspto)

190 195 200

aac cgt tct ttc tat gcg aac aat cat tgc atc gga aca gac ctg aat 674
Asn Arg Ser Phe Tyr Ala Asn Asn His Cys Ile Gly Thr Asp Leu Asn
205 210 215

agc aac ttt gtc tcc aaa cac tgg tgt gag gaa ggt gca tcc agt tcc 722
Ser Asn Phe Val Ser Lys His Trp Cys Glu Glu Gly Ala Ser Ser Ser
220 225 230 235

tca tgc tcg gaa acc tac tgt gga ctt tat cct gag tca gaa cca gaa 770
Ser Cys Ser Glu Thr Tyr Cys Gly Leu Tyr Pro Glu Ser Glu Pro Glu
240 245 250

gtg aag gca gtg gct agt ttc ttg aga aga aat atc aac cag att aaa 818
Val Lys Ala Val Ala Ser Phe Leu Arg Arg Asn Ile Asn Gln Ile Lys
255 260 265

gca tac atc agc atg cat tca tac tcc cag cat ata gtg ttt cca tat 866
Ala Tyr Ile Ser Met His Ser Tyr Ser Gln His Ile Val Phe Pro Tyr
270 275 280

tcc tat aca cga agt aaa agc aaa gac cat gag gaa ctg tct cta gta 914
Ser Tyr Thr Arg Ser Lys Ser Lys Asp His Glu Glu Leu Ser Leu Val
285 290 295

This Page Blank (uspto)

gcc agt gaa gca gtt cgt gct att gac aaa act agt aaa aat acc agg 962
Ala Ser Glu Ala Val Arg Ala Ile Asp Lys Thr Ser Lys Asn Thr Arg
300 305 310 315

tat aca cat ggc cat ggc tca gaa acc tta tac cta gct cct gga ggt 1010
Tyr Thr His Gly His Gly Ser Glu Thr Leu Tyr Leu Ala Pro Gly Gly
320 325 330

ggg gac gat tgg atc tat gat ttg ggc atc aaa tat tcg ttt aca tca 1058
Gly Asp Asp Trp Ile Tyr Asp Leu Gly Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Ser
335 340 345

aac cca cct gta gag aag ctt ttg ccg ctg tct cta aaa tagcttggca 1107
Asn Pro Pro Val Glu Lys Leu Leu Pro Leu Ser Leu Lys
350 355 360

tgtcattagg aatgtttaat gcccctgatt ttatcattct gcttccgtat tttaatttac 1167

tgattccagc aagaccaaat cattgtatca gattattttt aagttttatc cgtagttttg 1227

ataaaagatt ttcctattcc ttggttctgt cagagaacct aataagtgct actttgccat 1287

taaggcagac tagggttcat gtctttttac cctttaaaaa aaaattgtaa aagtctagtt 1347

acctactttt tctttgattt tcgacgtttg actagccatc tcaagcaact ttcgacgttt 1407

This Page Blank (uspto)

gactagccat ctcaagcaag tttaatcaaa gatcatctca cgctgatcat tggatcctac 1467

tcaacaaaag gaagggtggt cagaagtaca ttaaagattt ctgctccaaa ttttcaataa 1527

atttcttctt ctcctttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1573

<210> 2

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Leu Cys Ser Leu Ala Val Leu Val Pro Ile Val Leu Phe Cys
1 5 10 15

Glu Gln His Val Phe Ala Phe Gln Ser Gly Gln Val Leu Ala Ala Leu
20 25 30

Pro Arg Thr Ser Arg Gln Val Gln Val Leu Gln Asn Leu Thr Thr Thr
35 40 45

Tyr Glu Ile Val Leu Trp Gln Pro Val Thr Ala Asp Leu Ile Val Lys
50 55 60

Lys Lys Gln Val His Phe Phe Val Asn Ala Ser Asp Val Asp Asn Val

This Page Blank (uspto)

65 70 75 80

Lys Ala His Leu Asn Val Ser Gly Ile Pro Cys Ser Val Leu Leu Ala
85 90 95

Asp Val Glu Asp Leu Ile Gln Gln Gln Ile Ser Asn Asp Thr Val Ser
100 105 110

Pro Arg Ala Ser Ala Ser Tyr Tyr Glu Gln Tyr His Ser Leu Asn Glu
115 120 125

Ile Tyr Ser Trp Ile Glu Phe Ile Thr Glu Arg His Pro Asp Met Leu
130 135 140

Thr Lys Ile His Ile Gly Ser Ser Phe Glu Lys Tyr Pro Leu Tyr Val
145 150 155 160

Leu Lys Val Ser Gly Lys Glu Gln Thr Ala Lys Asn Ala Ile Trp Ile
165 170 175

Asp Cys Gly Ile His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Leu
180 185 190

Trp Phe Ile Gly His Asn Arg Met Trp Arg Lys Asn Arg Ser Phe Tyr
195 200 205

This Page Blank (uspto)

Ala Asn Asn His Cys Ile Gly Thr Asp Leu Asn Ser Asn Phe Val Ser
210 215 220

Lys His Trp Cys Glu Glu Gly Ala Ser Ser Ser Ser Cys Ser Glu Thr
225 230 235 240

Tyr Cys Gly Leu Tyr Pro Glu Ser Glu Pro Glu Val Lys Ala Val Ala
245 250 255

Ser Phe Leu Arg Arg Asn Ile Asn Gln Ile Lys Ala Tyr Ile Ser Met
260 265 270

His Ser Tyr Ser Gln His Ile Val Phe Pro Tyr Ser Tyr Thr Arg Ser
275 280 285

Lys Ser Lys Asp His Glu Glu Leu Ser Leu Val Ala Ser Glu Ala Val
290 295 300

Arg Ala Ile Asp Lys Thr Ser Lys Asn Thr Arg Tyr Thr His Gly His
305 310 315 320

Gly Ser Glu Thr Leu Tyr Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asp Asp Trp Ile
325 330 335

Tyr Asp Leu Gly Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Ser Asn Pro Pro Val Glu
340 345 350

This Page Blank (uspto)

Lys Leu Leu Pro Leu Ser Leu Lys
355 360

<210> 3

<211> 338

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Phe Gln Ser Gly Gln Val Leu Ala Ala Leu Pro Arg Thr Ser Arg Gln
1 5 10 15

Val Gln Val Leu Gln Asn Leu Thr Thr Thr Tyr Glu Ile Val Leu Trp
20 25 30

Gln Pro Val Thr Ala Asp Leu Ile Val Lys Lys Lys Gln Val His Phe
35 40 45

Phe Val Asn Ala Ser Asp Val Asp Asn Val Lys Ala His Leu Asn Val
50 55 60

Ser Gly Ile Pro Cys Ser Val Leu Leu Ala Asp Val Glu Asp Leu Ile
65 70 75 80

This Page Blank (uspto)

Gln Gln Gln Ile Ser Asn Asp Thr Val Ser Pro Arg Ala Ser Ala Ser
85 90 95

Tyr Tyr Glu Gln Tyr His Ser Leu Asn Glu Ile Tyr Ser Trp Ile Glu
100 105 110

Phe Ile Thr Glu Arg His Pro Asp Met Leu Thr Lys Ile His Ile Gly
115 120 125

Ser Ser Phe Glu Lys Tyr Pro Leu Tyr Val Leu Lys Val Ser Gly Lys
130 135 140

Glu Gln Thr Ala Lys Asn Ala Ile Trp Ile Asp Cys Gly Ile His Ala
145 150 155 160

Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Leu Trp Phe Ile Gly His Asn
165 170 175

Arg Met Trp Arg Lys Asn Arg Ser Phe Tyr Ala Asn Asn His Cys Ile
180 185 190

Gly Thr Asp Leu Asn Arg Asn Phe Ala Ser Lys His Trp Cys Glu Glu
195 200 205

Gly Ala Ser Ser Ser Ser Cys Ser Glu Thr Tyr Cys Gly Leu Tyr Pro
210 215 220

This Page Blank (uspto)

Glu Ser Glu Pro Glu Val Lys Ala Val Ala Ser Phe Leu Arg Arg Asn
225 230 235 240

Ile Asn Gln Ile Lys Ala Tyr Ile Ser Met His Ser Tyr Ser Gln His
245 250 255

Ile Val Phe Pro Tyr Ser Tyr Thr Arg Ser Lys Ser Lys Asp His Glu
260 265 270

Glu Leu Ser Leu Val Ala Ser Glu Ala Val Arg Ala Ile Glu Lys Thr
275 280 285

Ser Lys Asn Thr Arg Tyr Thr His Gly His Gly Ser Glu Thr Leu Tyr
290 295 300

Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asp Asp Trp Ile Tyr Asp Leu Gly Ile Lys
305 310 315 320

Tyr Ser Phe Thr Ser Asn Pro Pro Val Glu Lys Leu Leu Pro Leu Ser
325 330 335

Leu Lys

This Page Blank (uspto)

<210> 4

<211> 246

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Ala Ser Tyr Tyr Glu Gln Tyr His Ser Leu Asn Glu Ile Tyr
1 5 10 15

Ser Trp Ile Glu Phe Ile Thr Glu Arg His Pro Asp Met Leu Thr Lys
20 25 30

Ile His Ile Gly Ser Ser Phe Glu Lys Tyr Pro Leu Tyr Val Leu Lys
35 40 45

Val Ser Gly Lys Glu Gln Thr Ala Lys Asn Ala Ile Trp Ile Asp Cys
50 55 60

Gly Ile His Ala Arg Glu Trp Ile Ser Pro Ala Phe Cys Leu Trp Phe
65 70 75 80

Ile Gly His Asn Arg Met Trp Arg Lys Asn Arg Ser Phe Tyr Ala Asn
85 90 95

Asn His Cys Ile Gly Thr Asp Leu Asn Arg Asn Phe Ala Ser Lys His
100 105 110

This Page Blank (uspto)

Trp Cys Glu Glu Gly Ala Ser Ser Ser Ser Cys Ser Glu Thr Tyr Cys
115 120 125

Gly Leu Tyr Pro Glu Ser Glu Pro Glu Val Lys Ala Val Ala Ser Phe
130 135 140

Leu Arg Arg Asn Ile Asn Gln Ile Lys Ala Tyr Ile Ser Met His Ser
145 150 155 160

Tyr Ser Gln His Ile Val Phe Pro Tyr Ser Tyr Thr Arg Ser Lys Ser
165 170 175

Lys Asp His Glu Glu Leu Ser Leu Val Ala Ser Glu Ala Val Arg Ala
180 185 190

Ile Glu Lys Thr Ser Lys Asn Thr Arg Tyr Thr His Gly His Gly Ser
195 200 205

Glu Thr Leu Tyr Leu Ala Pro Gly Gly Gly Asp Asp Trp Ile Tyr Asp
210 215 220

Leu Gly Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Ser Asn Pro Pro Val Glu Lys Leu
225 230 235 240

Leu Pro Leu Ser Leu Lys

This Page Blank (uspto)

245

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially synthesized oligopeptide sequence

<400> 5

Thr Pro Glu Glu Arg His Leu Ser Lys Met Gln Gln Asn Gly Tyr Glu
1 5 10 15

Asn Pro Thr Tyr Lys Phe Phe Glu
20

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

This Page Blank (uspto)

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially synthesized primer sequence

<400> 6

gcctccgcat cgtactatga acagtatcac 30

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially synthesized primer sequence

<400> 7

ggttcatagg ccataatcga atgt 24

<210> 8

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially

This Page Blank (uspto)

synthesized primer sequence

<400> 8

tcaggggcat taaacattcc taat 24

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially synthesized oligopeptide sequence

<400> 9

Ser Asn Pro Pro Val Glu Lys Leu Leu Pro Leu Ser Leu Lys

1 5 10

This Page Blank (uspto)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/02878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N 9/48, 15/57, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/40, C12Q 1/37, A61K 38/48, 39/395, 45/00, G01N 33/573

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C12N 9/48-9/76, 15/00-15/90, 1/10-1/21, 5/10-5/28, C07K 16/40, C12P 21/00-21/02, C12Q 1/34-1/37

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI/L(DIALOG),BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, JICST FILE(JOIS), CA(STN), REGISTRY(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	MATSUMOTO, A. et al. "A novel carboxypeptidase B that processesnative beta-amyloid precursor protein is present in human hippocampus", Eur. J. Neurosci (January, 2000) Vol.12, No.1, pp.227-238	1-26,30,31
X	EATON, D. L. et al. "Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma", J. Biol. Chem. (November, 1991) Vol.266, No.32, pp.21833-21838	10
X	SHIOI, J. et al. "Chondroitin sulfate proteoglycan form of the Alzheimer's beta-amyloid precursor", J. Biol. Chem. (July, 1992) Vol.267, No.20, pp.13819-13822	12,13
X	KANG, J. et al. "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor", Nature (February, 1987) Vol.325, No.6106, pp.733-736	12,13
X	MATSUMOTO, A. et al. "A human brain proteolytic activity capable of cleaving natural beta-amyloid precursor protein is affected by its substrate glycoconjugates." Neurosci. Lett. (February, 1998) Vol.242, No.2,	16,17

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 May, 2000 (29.05.00)	06 June, 2000 (06.06.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/02878

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	pp.109-113	
A	TAN, A. K. et al. "Activation and characterization of procarboxypeptidase B from human plasma", Biochemistry (May, 1995) Vol.34, No.17, pp.5811-5816	1-26,30,31
A	MATSUMOTO, A. et al. "Aberrant proteolysis of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease lymphoblastoid cells", Eur. J. Biochem. (October, 1993) Vol.217, No.1, pp.21-27	1-26,30,31
A	MATSUMOTO, A. et al. "Abnormal and deficient processing of beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease lymphoblastoid cells", Biochem. Biophys. Res. Commun. (March, 1991) Vol.175, No.2, pp.361-365	1-26,30,31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/02878

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuati n of item 1 f first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 27-29
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claim 27-29 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by this International Search Authority.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark n Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

This Page Blank (uspto)

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ００／０２８７８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl⁷　C12N 9/48, 15/57, 15/63, 1/15, 1/19, 1/21, 5/10, C12P 21/02, C07K 16/40, C12Q 1/37, A61K 38/48, 39/395, 45/00, G01N 33/573

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl⁷　C12N 9/48-9/76, 15/00-15/90, 1/10-1/21, 5/10-5/28, C07K 16/40, C12P 21/00-21/02, C12Q 1/34-1/37

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI/L(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), MEDLINE, JICSTファイル(JOIS), CA(STN), REGISTRY(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
P, X	MATSUMOTO, A. et al. "A novel carboxypeptidase B that processes native beta-amyloid precursor protein is present in human hippocampus.", Eur. J. Neurosci. (2000, Jan.) Vol. 12, No. 1, p. 227-238	1-26, 30, 31
X	EATON, D. L. et al. "Isolation, molecular cloning, and partial characterization of a novel carboxypeptidase B from human plasma.", J. Biol. Chem. (1991, Nov.) Vol. 266, No. 32, p. 21833-21838	10
X	SHIOI, J. et al. "Chondroitin sulfate proteoglycan form of the	12, 13

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日　２９．０５．００	国際調査報告の発送日　06.06.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　２９３７ 内田　俊生　印 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
	Alzheimer's beta-amyloid precursor.", J. Biol. Chem. (1992, Jul.) Vol. 267, No. 20, p. 13819-13822	
X	KANG, J. et al. "The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor.", Nature (1987, Feb.) Vol. 325, No. 6106, p. 733-736	12, 13
X	MATSUMOTO, A. et al. "A human brain proteolytic activity capable of cleaving natural beta-amyloid precursor protein is affected by its substrate glycoconjugates.", Neurosci. Lett. (1998, Feb.) Vol. 242, No. 2, p. 109-113	16, 17
A	TAN, A. K. et al. "Activation and characterization of procarboxypeptidase B from human plasma.", Biochemistry (1995, May) Vol. 34, No. 17, p. 5811-5816	1-26, 30, 31
A	MATSUMOTO, A. et al. "Aberrant proteolysis of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease lymphoblastoid cells.", Eur. J. Biochem. (1993, Oct.) Vol. 217, No. 1, p. 21-27	1-26, 30, 31
A	MATSUMOTO, A. et al. "Abnormal and deficient processing of beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease lymphoblastoid cells.", Biochem. Biophys. Res. Commun. (1991, Mar.) Vol. 175, No. 2, p. 361-365	1-26, 30, 31

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ００／０２８７８

第Ⅰ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☒ 請求の範囲 ２７－２９ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲２７－２９は、人の身体の診断方法に関するものであって、国際調査機関が国際調査することを要しない対象にあたる。

2．☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

This Page Blank (uspto)